

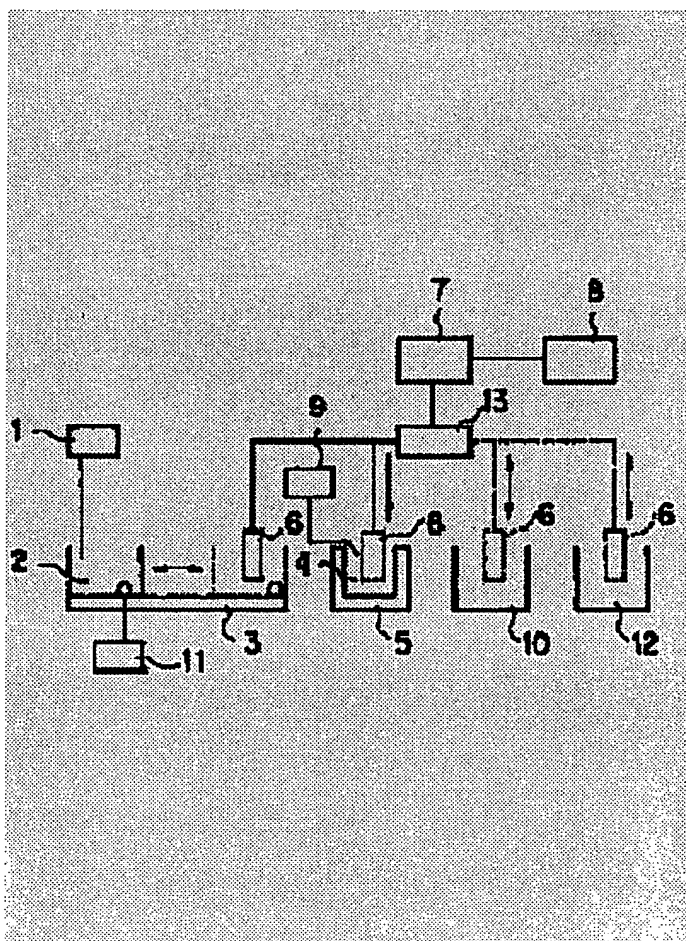
METHOD FOR DETECTING GENE

Patent number: JP5285000
Publication date: 1993-11-02
Inventor: HASHIMOTO KOJI; others: 03
Applicant: TOSHIBA CORP
Classification:
- international: C12Q1/68
- european:
Application number: JP19920242397 19920910
Priority number(s):

Abstract of JP5285000

PURPOSE: To simplify detection of gene and to raise sensitivity by immobilizing a nucleic acid of specimen modified into a single strand to the surface of an electrode, etc., associating the nucleic acid with a single stranded nucleic acid probe, adding specific double stranded recognition material to the reaction element and measuring electrochemical change, etc.

CONSTITUTION: Cells to be measured are fed to a device 1 for purifying a nucleic acid of specimen and a specimen solution containing the nucleic acid of specimen modified into a single strand is prepared and sent to an immobilizing tank 2. The immobilizing tank is moved on a rail 3 to the lower position of a carrier 6 and the nucleic acid of specimen is adsorbed on the surface of the carrier (the surface of electrode or the tip of optical fiber). The carrier is moved to a reactor 4, a single stranded nucleic acid probe in the reactor is associated with the nucleic acid of specimen on the carrier, cleansed and moved to a detecting tank 10. In the detecting tank, an electrochemically or photochemically active double stranded recognition material to be specifically linked to a double stranded nucleic acid is bonded to the double stranded nucleic acid on the surface of the carrier and an electrochemical or photochemical signal is inputted through an electric signal detecting control device 7 to a computer 8 and analyzed.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-285000

(43) 公開日 平成5年(1993)11月2日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A	A 8114-4B		

審査請求 未請求 請求項の数2 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願平4-242397	(71) 出願人	000003078 株式会社東芝 神奈川県川崎市幸区堀川町72番地
(22) 出願日	平成4年(1992)9月10日	(72) 発明者	橋本 幸二 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株 式会社東芝総合研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平4-25621	(72) 発明者	三輪 桂子 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株 式会社東芝総合研究所内
(32) 優先日	平4(1992)2月13日	(72) 発明者	石森 義雄 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株 式会社東芝総合研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 遺伝子検出法

(57) 【要約】

【構成】一本鎖に変性された試料核酸を電極表面または光ファイバ先端に固定化し、目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと反応させ、さらに二本鎖核酸に特異的に結合し、且つ電気化学的または光化学的に活性な二本鎖認識体と反応させる。反応終了後、電極または光ファイバを介して二本鎖核酸に由来する電気化学的または光化学的变化を測定する。また、核酸プローブを電気化学的または光化学的に活性な物質で標識し、この標識物質に由来する電気化学的または光化学的变化を測定することにより、二本鎖認識体を用いることなく遺伝子の検出を行なうことができる。

【効果】放射性同位体を用いることなく、安全かつ簡便に、短時間で遺伝子の検出を行なうことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された試料核酸とを反応させた後、該核酸プローブと該試料核酸とのハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸の有無を検出することによって目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、
該試料核酸を電極表面、または光ファイバー先端に固定化して用いることと、
二本鎖核酸に特異的に結合し、且つ電気化学的または光化学的に活性な二本鎖認識体を、核酸プローブと試料核酸との反応系に添加することと、
該電極または該光ファイバを介した電気化学的または光化学的な測定により、該電極または該光ファイバに固定化された二本鎖認識体の検出を行なうことを特徴とする遺伝子検出法。

【請求項2】 検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された試料核酸とを反応させた後、該核酸プローブと該試料核酸とのハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸の有無を検出することによって目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、
該試料核酸を電極表面、または光ファイバー先端に固定化して用いることと、
該核酸プローブが予め標識物質で標識されたプローブであることと、
該電極または該光ファイバを介した電気化学的または光化学的な測定により、該電極または該光ファイバに固定化された核酸プローブの検出を行なうことを特徴とする遺伝子検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、試料中に存在する特定の遺伝子の特異的に検出するための遺伝子検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子 (DNA) に蓄えられる遺伝情報は、メッセンジャーRNA (mRNA) を介して蛋白質あるいは酵素として表現される。この蛋白質や酵素の働きにより、生命の維持に必要な様々な化合物の生合成および代謝が行なわれる。このように、遺伝子に支配された多様な物質の動的平衡系として、生物が存在しているわけである。

【0003】 ヒトの遺伝子の総数は5～10万といわれている。これら遺伝子の中に、例えば欠損や重複のような何等かの異常や変化が生じると、生成される蛋白質の特性、種類および量などが変化し、結果として生体系のバランスが崩れて疾病を引き起こすことになる。従って、逆に病因となる既知の遺伝子を検出することによって、疾患の同定や予防が可能である。このような遺伝子

そのものに基づく診断は、近年の遺伝子工学の進歩によって可能となったもので、遺伝子診断と呼ばれている。

【0004】 従来の診断法と比較して、遺伝子診断には次のような幾つかの特色がある。

【0005】 遺伝子発現の機構を考えると、殆どの生化学レベルでの変化に先行して、遺伝子上での変化が生じていることが推定される。従って、遺伝子変化の検出による遺伝子診断では、病気という表現型での変化に先だって、即ち、発症前や病気の潜伏期あるいは極めて初期の段階で、診断や予測ができる。これが第一の特色である。第二の特色は、生体内の細胞では遺伝子は全て同一であるので、遺伝性の疾患に関する遺伝子診断法は、分析する臓器や組織に依存しないことである。このことは、特に胎児での診断では重要である。即ち、この特色によって、妊婦から羊水を採取し、羊水中に浮遊している胎児の細胞を調べるだけで診断を行なうことが可能となる。

【0006】 一般的な遺伝子診断法において、従来用いられている遺伝子検出法の手順を略記すれば次の通りである。

【0007】 まず、試料から遺伝子を抽出し、必要があれば適当な制限酵素で切断した後、電気泳動およびサザンブロットを行なう。次に、目的とする遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する核酸プローブ (通常は、放射性同位元素でラベルされている) を、ブロットされた遺伝子とハイブリダイスさせる。続いて、低温でX線フィルムに感光させることによりハイブリダイズされた核酸プローブを検出し、目的とする遺伝子の存在を確認する。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 上記従来の検出法は、放射性同位元素を使用するため診断場所が限定され、試薬の取扱いにも十分注意しなければならない。この点を改善するために、放射性同位元素に代わる安全なラベル剤の開発が進められており、例えばアビジン-ビオチン結合を利用する方法、酵素や蛍光物質を使用する方法等、幾つかのプローブ検出方法が既に提案されている。しかし、これらは感度の点で放射性同位元素を凌駕するまでには至っていない。また、何れの方法も遺伝子検出までに少なくとも2～3日間を要し、測定操作もかなり複雑かつ複雑であるという問題がある。

【0009】 一方、試料中に存在する特定の抗原または抗体の定量分析には、一般にラジオイムノアッセイ (以下、RIAと略記する) が用いられている。しかしながら、RIAでは前記の遺伝子診断方法と同様に放射性同位体を用いるため、専用の機器を設置し、その操作も放射性同位体取扱いの資格を有するオペレータが行なわなければならない。これに加えて廃棄物の処理等にも注意を必要とする。また、その他の分析方法として、例えば免疫電気泳動法が知られているが、この方法は測定に長

時間を要するうえ感度が低く、被検物質がごく微量にしか含まれていない場合には適用することができない。

【0010】本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、安全性および簡便性に優れると共に、短時間で目的とする遺伝子の有無を高感度に検出することができる遺伝子検出法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明による遺伝子検出法は、検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された試料核酸とを反応させた後、前記核酸プローブと前記試料核酸とのハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸の有無を検出することによって前記目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、前記試料核酸を電極表面、または光ファイバー先端に固定化して用いることと、二本鎖核酸に特異的に結合し、且つ電気化学的または光化学的に活性な二本鎖認識体を、前記核酸プローブと試料核酸との反応系に添加することと、前記電極または前記光ファイバを介した電気化学的または光化学的な測定により、前記電極または前記光ファイバに固定化された二本鎖認識体の検出を行なうことを特徴とするものである。

【0012】この遺伝子検出法において、電極または光ファイバに固定化された二本鎖認識体が検出されることは、電極または光ファイバの表面上に二本鎖核酸が形成されていることを意味し、これは、電極または光ファイバ上に固定化された試料核酸が目的遺伝子であることを示している。

【0013】また、本発明は、検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された試料核酸とを反応させた後、前記核酸プローブと前記試料核酸とのハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸の有無を検出することによって前記目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、前記試料核酸を電極表面、または光ファイバー先端に固定化して用いることと、前記核酸プローブが予め標識物質で標識されたプローブであることと、前記電極または前記光ファイバを介した電気化学的または光化学的な測定により、前記電極または前記光ファイバに固定化された核酸プローブの検出を行なうことを特徴とする遺伝子検出法をも提供する。

【0014】以下、本発明の遺伝子検出法をより詳細に説明する。

【0015】本発明において「二本鎖認識体」とは、二本鎖の核酸を認識し、特異的に結合する物質を指す。したがって、担体上に固定化された試料核酸と核酸プローブとの反応により担体上に二本鎖核酸が形成された場合には、形成された二本鎖核酸と結合することにより二本鎖認識体が担体上に固定化されることになる。このような物質としては、例えば、挿入剤、二本鎖核酸を認識す

る生体高分子を挙げることができる。

【0016】挿入剤と呼ばれる物質は、二本鎖DNA等の二本鎖核酸に特異的に結合する特徴がある。これら挿入剤は何れも分子中にフェニル基等の平板状挿入基を有し、この挿入基が二本鎖核酸の塩基対と塩基対の間に介入することによって、二本鎖核酸と結合する。挿入剤の多くは光学活性物質であり、核酸の定性に用いられているものもある。また、挿入剤の中には電極応答する物質もある。従って、光学的变化または電気化学的变化の測定によって、二本鎖核酸に結合した挿入剤を検出することができる。

【0017】本発明で用いる電気化学的、光化学的に活性な挿入剤は特に限定されるものではなく、例えばエチジウム、エチジウムブロマイド、アクリジン、アミノアクリジン、アクリジンオレンジ、プロフラビン、エリブチシン、アクチノマイシンD、ドーノマイシン、マイトマイシンC、ヘキスト33342、ヘキスト33258、アクラルピシン、DAPI、アドリアマイシン、エビルピシン、ピラルピシン、アクラシノマイシン、また、トリス（フェナントロリン）亜鉛錯体、トリス（フェナントロリン）ルテニウム錯体、トリス（フェナントロリン）コバルト錯体、ジ（フェナントロリン）亜鉛錯体、ジ（フェナントロリン）ルテニウム錯体、ジ（フェナントロリン）コバルト錯体、ビビリジンプラチナ錯体、タービリジンプラチナ錯体、フェナントロリンプラチナ錯体、トリス（ビビリジル）亜鉛錯体、トリス（ビビリジル）ルテニウム錯体、トリス（ビビリジル）コバルト錯体、ジ（ビビリジル）亜鉛錯体、ジ（ビビリジル）ルテニウム錯体、ジ（ビビリジル）コバルト錯体等を用いることができる。また、その他の使用可能な挿入剤としては、特開昭62-282599号公報に記載されたものが挙げられる。

【0018】また、電極を用いて電気化学的变化を検出する場合には、挿入剤として、上述の挿入剤自身が酸化還元反応に対して可逆的である物質の他に、電気的に可逆な酸化還元反応を起こす物質を中心金属として含有する金属錯体、すなわちメタロインターカラーターを用いることができる。このようなメタロインターカラーターとしては、例えばトリス（フェナントロリン）亜鉛錯体、トリス（フェナントロリン）ルテニウム錯体、トリス（フェナントロリン）コバルト錯体、ジ（フェナントロリン）亜鉛錯体、ジ（フェナントロリン）ルテニウム錯体、ジ（フェナントロリン）コバルト錯体、ビビリジンプラチナ錯体、タービリジンプラチナ錯体、フェナントロリンプラチナ錯体、トリス（ビビリジル）亜鉛錯体、トリス（ビビリジル）ルテニウム錯体、トリス（ビビリジル）コバルト錯体、ジ（ビビリジル）亜鉛錯体、ジ（ビビリジル）ルテニウム錯体、ジ（ビビリジル）コバルト錯体を挙げることができる。挿入剤はこれらに限定されるものではないが、錯体の中心金属もしく

5

は挿入剤自身の酸化還元電位が核酸の酸化還元電位以上であったり、核酸の酸化還元電位に重なることのないものが望ましい。

【0019】このような電気化学的に可逆である酸化還元反応を起こす挿入剤を用いることにより、酸化還元電流を繰り返して測定することが可能となる。したがって、電位走査を数回ないし数百回繰り返し、得られた信号の値を積算することにより信号の増幅を行なうことができ、その結果、より高感度の検出が可能となる。

【0020】さらに、電極を用いて遺伝子の検出を行なう場合には、電気化学発光を生じる挿入剤を利用することもできる。このような挿入剤は特に限定されるものではなく、例えば、ルミノール、ルシゲニン、ピレン、ジフェニルアントラセン、ルブレン及びアクリジニウム誘導体を挙げることができる。これらの挿入剤による電気化学発光は、ホタルルシフェリン、ジヒドロルシフェリンのようなルシフェリン誘導体、フェニルフェノール、クロロフェノールのようなフェノール類もしくはナフトール類のようなエンハンサーを用いることにより増強することが可能である。

【0021】電気化学発光によって生じた光学的な信号は、例えば、フォトンカウンタを用いて溶液から直接検出すればよい。また、電極の代わりに、光ファイバーの先端に透明電極を形成することにより作成した光ファイバー電極を用いて間接的に検出することもできる。

【0022】電極反応または光学的な信号の変化は担体表面でしか起こらないことから、未反応のプロブや未反応の挿入剤を除去することなく非常に簡単に検出を行なうこともできる。

【0023】なお、本発明において、核酸プローブと一本鎖試料核酸との反応は、一般的に溶液中で行なわれる。その際、上記の挿入剤の存在下で核酸プローブと試料核酸との反応を行なってもよく、また該反応の終了後に挿入剤を添加しても良い。

【0024】上述のように、多くの挿入剤はそれ自体で光学活性を有するか、または電極応答が可能な物質であり、光学的または電気化学的な測定により直接測定を行なうことができる。このような挿入剤に、さらに直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質を結合させ、挿入剤自身の信号と併せて測定することにより検出の感度を高めることが可能である。

【0025】このような直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質としては、例えば、ピオチン、トリニトロベンゼンスルホン酸、ジニトロベンゼンスルホン酸等のハプテン、フルオレセインイソチアネート(FITC)、フィコシアニン、ローダミン等の蛍光物質、ルミノール、ルシゲニン、アクリジニウムエステル誘導体等の発光物質、フェロセン、ピオロゲン等の電極活性物質を挙げることができる。上記ハプテンのように直接信号を検出することができない物質を用いる場合に

6

は、酵素結合アビジンのような酵素結合抗ハプテン抗体を利用して酵素反応による物質の吸光、蛍光、発光、消光、円偏光二色性、蛍光偏光のような光学的情報を測定するか、もしくは電極活性を測定することにより間接的に遺伝子の検出を行なう。

【0026】これらの物質は、通常、挿入剤1分子当たり1分子結合させるが、同種の物質を挿入剤1分子当たり複数分子結合させることにより、さらに感度を高めることができる。

【0027】これとは別に、生体高分子の中には二本鎖核酸を認識して特異的に結合する物質が存在する。したがって、このような生体高分子もしくはこの生体高分子を認識する物質に、酵素、蛍光物質、発光物質のような標識物質を結合し、この標識物質に起因する電気化学的もしくは光学的な変化を測定して生体高分子の存在の有無を確認することにより二本鎖核酸を検出することが可能となる。

【0028】このような生体高分子としては、抗DNA抗体、クロタンパク質、cIリプレッサー、大腸菌のCRP(cAMP受容タンパク質)、ラクトースオペロンリプレッサーのようなDNA結合タンパク質、触媒活性が失活したRNase Hのような酵素を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、上記生体高分子は、生体由来であっても、合成により得られるものであっても良い。

【0029】上記生体高分子に結合させる標識剤としての酵素は特に限定されるものではなく、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼを挙げることができる。

【0030】上記生体高分子を用いて電気化学的变化を検出する場合には、例えば、NAD⁺/NADHサイクルにおけるNADH、カテコール/キノンサイクルにおけるキノンを利用することができる。すなわち、生体高分子に結合した酵素により生成したNADHもしくはキノンを電極自体で酸化もしくは還元し、その電気的变化を測定すれば良い。なお、このような電気化学的酸化還元反応に関わる物質は、これらに限定されるものではない。

【0031】上記生体高分子を用いて光学的変化を検出する場合には、生体高分子に酵素を結合し、化学発光基質を用いて酵素反応を行なうか、もしくは生体高分子に蛍光物質を結合してその蛍光を直接検出する。本発明で用いることができる化学発光基質は特に限定されるものではなく、使用可能な化学発光基質としては、ルミノール、イソルミノール、イソルミノール誘導体、アクリジニウム誘導体を挙げることができる。化学発光基質を使用する場合には、エンハンサーを用いて化学発光を増強させることもできる。このエンハンサーとしては、特に限定されるものではないが、例えばホタルルシフェリン、デヒドロルシフェリンのようなルシフェリン誘導

体、フェニルフェノール、クロロフェノールのようなフェノール類もしくはナフトール類を挙げることができる。さらに、本発明で用いることができる蛍光物質は特に限定されるものではなく、使用可能な蛍光物質としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコシアニンを挙げることができる。

【0032】二本鎖認識体の添加量は特に限定されるものではないが、効率の点からは形成された全ての二本鎖に結合するに十分な量であることが好ましい。過剰に添加して未反応のまま残存する二本鎖認識体は、測定の前

10 に洗浄除去する。
【0033】二本鎖認識体の添加量が少なく低濃度である場合には、二本鎖認識体が形成された二本鎖核酸と結合すると、系内に残存する未反応の二本鎖認識体の量は極少量となる。すなわち、相対的に、二本鎖認識体は担体上に濃縮された状態となる。このような状態においては、試料核酸と未反応の核酸プローブ、および形成された二本鎖に結合していない遊離の二本鎖認識体とを洗浄除去することなく遺伝子の検出を行なうことができ、ハイブリダイゼーションから目的遺伝子の検出まで全ての

20 反応を同一系内で連続的に行なうことが可能となる。
【0034】このように本発明は、二本鎖認識体の電気化学的或いは光学的な信号の変化を測定することで遺伝子の有無を検出することを特徴とするが、更に、ハイブリダイゼーション反応におけるこれらの信号の変化をモニター等を用いて経時的に測定することにより、当該反応の進行状態を判断することもできる。従来は、ハイブリダイゼーション反応を行う際には、当該反応が十分起きているであろう時間を経験的に設定していたために、必要以上に長い時間を要したり、或いは逆に反応が

30 十分でないまま反応を終了させたりしている可能性があった。しかし、このようにハイブリダイゼーション反応中の二本鎖認識体による直接的或いは間接的な信号を経時的にモニタリングすると、どの時点で検出十分なハイブリダイゼーション反応が生じるかを決定することができるため、これによりハイブリダイゼーション反応を確実に行うことができ、また遺伝子検出に要する時間を短縮することも可能である。
【0035】本発明においては、使用する核酸プローブ

40 を変えることにより種々の遺伝子の検出を行なうことができる。使用することができる核酸プローブの例としては、食品に含まれる微生物、植物ウイルスもしくはウイロイド、魚類に感染する病原性微生物もしくはウイルス、人体に感染し、感染症等を引き起こす病原性微生物もしくはウイルス、遺伝病の原因遺伝子、活性化プロトオンコジーン、またはミニサテライト塩基配列のそれぞれの全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを挙げることができる。

【0036】核酸プローブとして、食品に含まれる微生物の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列

を有するプローブを用いた場合には、食品に含まれる微生物の直接検出を行なうことができ、食品衛生検査が可能になる。このような食品に含まれる微生物としては、例えば、病原性的大腸菌、ブドウ球菌、サルモネラ菌を挙げることができる。

【0037】核酸プローブとして、植物ウイルスもしくはウイロイドの一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、植物に感染した植物ウイルスもしくはウイロイドの検出を行なうことができ、農業分野における感染症診断が可能になる。このような植物ウイルスもしくはウイロイドとしては、例えば、タバコモザイクウイルス、カリフラワーモザイクウイルスを挙げることができる。

【0038】核酸プローブとして魚類に感染する病原性微生物もしくはウイルスの全体あるいはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、魚類に感染する病原性微生物もしくはウイルスの検出を行なうことができ、水産分野における感染症診断が可能になる。このような魚類に感染する病原性微生物としては、例えば、病原性ピブリオを挙げることができる。

【0039】核酸プローブとして人体に感染し、感染症等を引き起こす病原性微生物もしくはウイルスの全体あるいはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、感染症診断が可能になる。このような人体に感染して感染症等を引き起こす病原性微生物としては、例えば、病原性微生物であるストレプトコッカス、マイコプラズマ、クロストリジウム、クラミジア、サルモネラ、単純ヘルペス、サイトメガロウイルス

30 を挙げることができる。
【0040】核酸プローブとして遺伝病の原因遺伝子の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、遺伝病の直接検定が可能になる。このような遺伝病の原因遺伝子としては、例えば、アデノシンデアミナーゼ欠損症、鎌状赤血球貧血の原因遺伝子を挙げることができる。

【0041】核酸プローブとして活性化プロトオンコジーンの全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、癌診断が可能になる。このような活性化プロトオンコジーンとしては、例えば、癌遺伝子データブック（渋谷正史、秀商社）に記載の癌遺伝子を挙げることができる。

【0042】核酸プローブとしてミニサテライト塩基配列の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、遺伝学的研究、個人識別、親子鑑定等に有用なDNAフィンガープリント法を行なうことが可能になる。このようなミニサテライト塩基配列としては、例えば、Myo配列、Alu配列、Per-6配列、Per配列を挙げることができる。

【0043】本発明において用いられる核酸プローブの

長さは特に限定されるものではなく、数mer ないし数百mer の一本鎖核酸を用いることができるが、S/N比を上げて検出の精度を高めるためには、十数mer ないし数十mer 程度の長さのものが好ましい。これは、次のような理由によるものである。

【0044】上述のように、二本鎖認識体は二本鎖核酸を認識して特異的に結合する物質である。しかしながら、二本鎖認識体は希に一本鎖核酸にも結合することがある。すなわち、未反応の核酸プローブにも結合する場合がある。このような結合が起こるとS/N比が低下し、検出の精度が悪化する。したがって、核酸プローブの長さは、目的とする遺伝子配列を検出するために最小限必要な長さに止めることが好ましい。

【0045】二本鎖認識体に直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質を結合させて検出の感度を高めることについては既述したが、二本鎖認識体ではなく核酸プローブを標識することによっても遺伝子検出の感度を高めることができる。この場合、核酸プローブに標識される標識剤は、二本鎖認識体と直接もしくは間接的に反応し、もしくはその相互作用により、二本鎖認識体および標識剤のいずれかが検出可能な信号を生じるようなものであればどのような物質でもよい。換言すると、核酸プローブが一本鎖の状態にあるときには信号が発生することはないが、核酸プローブが目的とする遺伝子と反応して二本鎖を形成し、さらにこの二本鎖に二本鎖認識体が結合して初めて信号が発生するような物質が標識剤として用いられる。遺伝子の検出は、この標識剤と二本鎖認識体との反応により生じる信号を測定することにより行なう。このような核酸プローブの標識剤は、用いられる二本鎖認識体により異なるが、例えば、ローダミン、FITCのような蛍光物質、ルミノール、アクリジニウムエステル誘導体のような発光物質、酵素、酵素基質を挙げることができる。二本鎖認識体としては、特に限定されるものではなく、上記のいずれの物質をも使用することができる。

【0046】ところで、核酸プローブに標識する物質が二本鎖認識体との相互作用によらずにそれ自体で信号を生じるものである場合には、二本鎖認識体を用いることなく遺伝子の検出を行なうことが可能となる。すなわち、担体上に固定化された試料核酸とのハイブリダイゼーションにより担体上に固定化された核酸プローブを、二本鎖認識体を介することなく核酸プローブ自体に標識された標識剤により検出することが可能となる。このような直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質としては、例えば、ピオチン、トリニトロベンゼンスルホン酸、ジニトロベンゼンスルホン酸等のハプテン、フルオレセインイソチアネート(FITC)、フィコシアニン、ローダミン等の蛍光物質、ルミノール、アクリジニウムエステル誘導体等の発光物質、ルシゲニン等の電気化学発光物質、フェロセン、ピオローゲン等の電

極活性物質、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等の酵素を挙げることができる。上記ハプテンのように直接信号を検出することができない物質を用いる場合には、酵素結合アビジンのような酵素結合抗ハプテン抗体を利用して酵素反応による物質の吸光、蛍光、発光、消光、円偏光二色性、蛍光偏光のような光学的情報を測定するか、もしくは電極活性を測定することにより間接的に遺伝子の検出を行なう。

【0047】これらの物質は、通常、プローブ1分子当たり1分子結合させるが、同種の物質をプローブ1分子当たり複数分子結合させることにより、さらに感度を高めることができる。

【0048】本発明の遺伝子検出法においては、一本鎖に変性した試料核酸を、電気化学的変化、光化学的変化等の物理変化を信号として検出可能な担体に固定化する。このような担体としては、電極もしくは光ファイバが好適に用いられるが、この他に信号の検出が可能な担体として、フォトダイオード、サーミスタ、ISFET、MOSFET、ピエゾ素子、表面弾性波素子、水晶発振器等を挙げることができる。

【0049】本発明で用いる電極は特に限定されるものではなく、使用可能な電極としては、例えばグラファイト、グラシーカーボン、パイロリティックグラファイト、カーボンペースト、カーボンファイバーのような炭素電極、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウムのような貴金属電極、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛のような酸化物電極、Si、Ge、ZnO、CdS、TiO₂、GaAsのような半導体電極、チタン等が挙げられる。これらの電極は導電性高分子によって被覆しても良く、これによって安定な試料核酸固定化電極を調製することができる。また、単分子膜によって被覆することもできる。

【0050】検体試料には、例えば、末梢静脈血のような血液、白血球、血清、尿、糞便、精液、唾液、培養細胞、各種臓器細胞のような組織細胞、その他核酸を含有するものを用いる。

【0051】検体試料からの核酸の抽出は従来法に準じて行なわれるが、上記二本鎖認識体を用いて以下の手順により抽出、精製することもできる。

【0052】まず、二本鎖認識体を適当な担体上に固定化し、この担体を検体試料と混合する。次に検体試料中の細胞を破壊して核酸を遊離させ、この核酸と二本鎖認識体とを結合させる。その後、担体を検体試料から分離し、さらに二本鎖認識体に結合した核酸を担体から分離する。

【0053】ここで用いられる担体は特に限定されるものではなく、例えば、ラテックス、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン等の高分子からなる担体、活性炭等の炭素系材料、金属粒子、セラミック、マグネタイト、サマリウム-コバルト、フェライト等の磁性体を

挙げることができる。担体の形態も特に限定されるものではないが、粒径 0.1~1000 μ m、特に 1~100 μ m の粒子であることが好ましい。

【0054】検体試料中の細胞の破壊は、常法により行なえばよく、例えば、振とう、超音波等の物理的作用を外部から加えて担体を振動させて行なう。また、核酸抽出溶液を用いて、細胞から核酸を遊離させることもできる。核酸抽出溶液の例としては、SDS、Triton-X、Tween-20のような界面活性剤、サポニン、EDTA、プロテアーゼ等を含む溶液を挙げることができる。これらの溶液を用いて核酸を溶出する場合には、37℃以上の温度でインキュベートすることにより反応を促進することができる。

【0055】担体に固定化された二本鎖認識体と核酸とを結合させた後、適当な手段により検体試料から担体を分離する。分離した担体は、まず洗浄液（低塩濃度）で洗浄して不要成分を除去し、次いで核酸溶出液（高塩濃度）で担体から溶液中に核酸を溶出する。二本鎖認識体として挿入剤を用いた場合には、核酸溶出液として非極性有機溶媒を用いる。

【0056】担体として磁性粒子を用いた場合には、担体の振動および分離操作を外部からの磁気作用でより簡便かつ迅速に行なうことが可能となり、好都合である。

【0057】目的とする遺伝子の含有量が微量である場合には、公知の方法により遺伝子を増幅した後検出を行なうこともできる。遺伝子を増幅する方法としては、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）等の酵素を用いる方法が代表的なものである。ここで、遺伝子増幅法に用いられる酵素としては、例えば、DNAポリメラーゼ、TaqポリメラーゼのようなDNA依存型DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼIのようなDNA依存型RNAポリメラーゼ、Q β レプリカーゼのようなRNA依存型RNAポリメラーゼを挙げることができる。なかでも、Taqポリメラーゼを用いるPCR法は温度を調節するだけで連続して増幅を繰り返すことができ、非常に有用な方法である。

【0058】このようにして得られたサンプル（核酸の粗抽出液あるいは精製した核酸溶液）は、90~98℃、好ましくは95℃以上の温度で熱変性し、一本鎖の試料核酸を調製する。一本鎖の核酸試料の調製は、アルカリ変性で行なうこともできる。次いで、この一本鎖試料核酸を、共有結合、イオン結合、吸着等によって電極表面、光ファイバー等の担体上に固定化する。

【0059】共有結合による固定化としては、例えば、担体表面を活性化し、その後、直接もしくは架橋剤を介して間接的に試料核酸を固定化する方法、担体に固定化する試料核酸に活性型の官能基を導入して担体に直接もしくは間接的に固定化する方法などを挙げることができる。ここで、担体表面の活性化は、例えば、酸化剤中における電解酸化、空気酸化、試薬酸化もしくは膜で被覆

することにより行なうことができる。また、使用し得る架橋剤としては、臭化シアン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシランのようなシランカップラー、カルボジイミド、塩化チオニル等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。さらに、試料核酸に導入される官能基としては、例えばアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、カルボニル基、リン酸基、アルデヒド基、およびメルカプト基を挙げることができるが、これらに限定されるものではなく、その他の反応性が高い官能基を用いることもできる。

【0060】担体表面を活性化するため表面を酸化すると、担体表面に酸化層が形成される。この酸化層を介して試料核酸と担体とが結合するのであるが、酸化層の厚さを薄くすることにより遺伝子検出におけるS/N比を向上させることができる。酸化層の厚さは、好ましくは500Å（オングストローム）以下、より好ましくは100Å以下である。

【0061】試料核酸末端への官能基の導入は、酵素反応もしくはDNA合成機を用いて行なうことができる。酵素反応において用いられる酵素としては、例えば、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ、ポリAポリメラーゼ、ポリヌクレオチドカイネース、DNAポリメラーゼ、ポリヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ、RNAリガーゼを挙げることができる。また、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR法）、ニッケトランスレーション、ランダムプライマー法により官能基を導入することもできる。

【0062】官能基は、試料核酸のどの部分に導入されてもよく、3'末端、5'末端もしくはランダムな位置に導入することができる。

【0063】特に、試料核酸を固定化しようとする担体が電極である場合には、吸着により、より簡単な操作で効率よく試料核酸を固定化することができる。電極表面への試料核酸の吸着は、例えば、次のように行なうことができる。まず、電極表面を、超音波洗浄器を用いて蒸留水およびアルコールで洗浄する。その後、電極を試料核酸を含有するリン酸緩衝液（pH 7.0）に挿入して試料核酸を担体表面に吸着させる。特に炭素電極に対しては、高温、高塩濃度下で吸着させるとよい。この際、電極に0~+1.0V、好ましくは0~+0.1Vの範囲で電位を印加することにより、試料核酸の吸着を促進することができる。次に、試料核酸を吸着させた電極をヌクレオチド（ATP、CTP、GTP、TTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP等）溶液中に挿入し、好ましくは0~+1.0Vの範囲で電位を印加しながら、電極表面をヌクレオチドで被覆する。これにより、種々の核酸や二本鎖認識体等の電極表面への非特異的な吸着が抑制される。また、非特異的な吸着は、界面活性剤、脂肪酸、脂肪等で電極表面を被覆することによっても抑制可能である。ここで、抑制効果のある物質としては、ス

テアリルアミン、アミノノナデカン等のアミン類、ジステアリルジメチルアンモニウムクロライド等のアンモニウム塩類を挙げることができる。

【0064】試料核酸を吸着により担体に固定化する場合、試料核酸を高イオン強度、例えばイオン強度0.1以上の溶液に溶解することにより試料核酸の吸着を促進することができる。

【0065】また、グアニジニウム塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、(イソ)チオシアン酸ナトリウム、尿素等のカオトロピック物質を添加することによ

【0066】試料核酸は、酵素固定化の一手法として知られる包括法において使用される包括剤を用いて担体に固定化することもできる。本発明において使用し得る包括剤は特に限定されるものではないが、例えばポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミドを挙げることができる。

【0067】さらに、試料核酸は膜を介して電極表面及びその他の担体表面に固定化することもできる。この際用いられる膜としては、例えば、ポリアセチレン、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリアニリンのような導電性高分子、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルクロライド、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリフッ化ビニリデン、セルロース、脂質膜を挙げることができる。また、LB膜のような単分子膜もしくは単分子膜が複数積層して多層を形成した膜を用いることもできる。

【0068】試料核酸の膜への固定化は、担体表面への固定化と同様の方法で行なうことができる。

【0069】共有結合により試料核酸を膜に固定化する場合、試料核酸に官能基を導入する代わりに膜に官能基を導入してもよい。膜に導入される官能基としては、試料核酸に導入される官能基と同様のものを用いることができる。このように膜に官能基を導入し、次いで試料核酸を反応させて固定化することにより、試料核酸に官能基を導入して固定化する場合よりも高い密度で試料核酸を固定化することができ、かつより安定な試料核酸固定化担体を得ることができる。

【0070】膜を介して試料核酸を固定化する担体が電極である場合には、上述のように核酸プローブと検体試料とのハイブリダイゼーションを行ない、その前後における膜電位の変化を測定することにより、目的とする遺伝子の存在の有無を検出することができる。

【0071】試料核酸固定化担体に振動子もしくは回転体としての機能を持たせることにより、担体表面近傍における流体の流れを相対的に増大させることができる。これにより、ハイブリダイゼーション反応の促進、非特異的反応の抑制などが達成され、遺伝子検出の効率を高めることが可能である。振動子としての機能は、例えば、物理的な振動、超音波、電気的もしくは磁気的作用を利用して担体を与えることができる。

【0072】試料核酸を固定化した担体は、そのままでは種々の核酸、二本鎖認識体等の非特異的な吸着が生じやすい。これは、感度の低下を招く要因となる。このような非特異的な吸着は、試料核酸を固定化した後、担体表面を吸着もしくは化学結合により核酸で被覆することにより抑制することが可能である。

【0073】この際、担体表面を被覆する核酸としては、例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジンのようなヌクレオシド、ウリジル酸、シチジル酸、アデニル酸、グアニル酸のようなヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、サケ精子DNAのような天然DNAを挙げることができる。

【0074】また、担体表面を被覆する核酸の長さおよび配列は、担体表面に固定化されている試料核酸と反応しない長さおよび配列であれば特に限定されるものではないが、1~100 bpの一本鎖、もしくは二本鎖核酸が望ましい。さらに、上述のように、非特異的な吸着は、界面活性剤、脂肪酸、脂質、或いは非毒性物質等の物質で被覆することによっても抑制することが可能である。このような物質としては、例えば、ステアリルアミン、アミノノナデカン等のアミン類、ジステアリルアミンジメチルアンモニウムクロライド等のアンモニウム塩類を挙げることができる。

【0075】本発明の遺伝子検出法においては、担体への試料核酸の固定化は上記方法にのみ限定されるものではなく、一般にタンパク質等の生体高分子の固相への固定化に用いられている方法を広く用いることができる。

【0076】担体に固定化される試料核酸の量は特に限定されるものではないが、固定化された試料核酸の密度が高いほど検出の感度が高くなり、S/N比が向上する。固定化される試料核酸の密度は、通常、平方cm当りアトモル(amol/cm^2)のオーダー以上であり、好ましくは平方cm当りナノモル(nmol/cm^2)のオーダー以上である。

【0077】このように本発明は、サンプルを変性させて一本鎖にし、これを試料核酸として用いて遺伝子の有無を検出することを特徴とし、これは特にウイルスの感染を遺伝子の有無だけで診断することができるエイズや肝炎の診断に対して有用である。しかし、特定の塩基配列の欠損や重複、点突然変異等により引き起こされる遺伝病或いは癌などは、単に遺伝子の存在を確認するのみでは足りず、ある特定の遺伝子上におこった異常を解析しなければ診断することができない。このような疾患の場合には、遺伝子を適当な制限酵素で切断し、特定の遺伝子が示す切断による分子量パターン(Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)を解析することで初めて診断可能となる。従って、RFLPにおいては、試料から核酸を抽出した後、当該核酸を適当な制限酵素で切断し、分子量ごとに分画する必要がある。

【0078】試料から抽出した核酸を切断する制限酵素は特に限定されず、通常RFLPに用いられるいずれのものを使用することも可能である。具体的には、例えば、AccI、AvaI、BamHI、HincII、HindIII、PstI、Bali、NsiI、HaeII、EcoRI、MspI等を用いることができる。

【0079】制限酵素で切断された遺伝子断片を分子量分画する方法は、特に限定されるものではないが、例えばアガロース電気泳動、ポリアクリルアミド電気泳動、パルスフィールド電気泳動、キャピラリー電気泳動、液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatographyを含む) などを用いることができる。

【0080】上記に挙げた方法により分子量分画した各遺伝子断片は、適当な方法により分画担体から溶出させ、アルカリまたは加熱により一本鎖に変性させた後、電気化学的或いは光学的信号を検出可能な担体に分子量ごとに固定化する。従来は、電気泳動により分子量分画を行い、これをフィルターに移しとって放射性同位元素で標識されたプローブをハイブリダイズさせた後、X線フィルムに感光させてハイブリダイゼーションの有無及び程度を確認し、疾患に特異的な電気泳動パターンを解析していたために、操作が複雑で、かつ測定に長時間を要していた。しかし、電気化学的或いは光学的信号を検出する本発明の方法を用いると、特定の遺伝子のRFLPを簡単に解析することが可能となる。

【0081】当該遺伝子断片を固定化するために用いることができる担体としては、一本鎖の試料核酸を固定化する際に用いたいずれのものでも使用できる。しかし、RFLPを行う際には特に、形状がテープ状である担体を用いることが好ましい。テープ状の担体を用いる場合には、上記のように分子量分画された各遺伝子断片を分画担体から溶出させる際に、溶出下端において速やかに一本鎖に解離させ、これと同時に、当該テープ状担体を経時的に水平移動させて、溶出と同時に固定化し、テープ状担体の移動方向に分子量分画された遺伝子を固定化することができる。従って、テープ状担体を用いると、より簡単に特定遺伝子の制限酵素切断パターン (RFLP) を得ることができ、かつ分子量分画後の遺伝子検出を簡便に行うことができる。

【0082】担体、特に電極もしくは光ファイバー表面に固定化された試料核酸は、核酸の酸化還元電流もしくは光学的な信号、あるいは一本鎖の核酸に特異的に結合する電気化学的もしくは光学的に活性な物質の酸化還元電流もしくは光学的な信号を測定することにより定量することができる。すなわち、担体が電極である場合には、例えばポテンシostat、ファンクションジェネレータ、レコーダ、および計算機からなる測定システムを用いて、核酸もしくは挿入剤に由来する酸化還元電流

の計測を行ない、固定化核酸の定量を行なう。また、担体が光ファイバーである場合には、核酸もしくは核酸に結合した挿入剤に由来する光学信号である吸光度、蛍光強度、発光、消光、円偏光二色性、蛍光偏光もしくはその他の光学的情報をそれぞれの信号に対応した測定装置を用いて測定することにより、固定化核酸の定量を行なう。核酸自体にはさほど顕著な活性がないため、従来行なわれている定量法は非常に複雑なものであったが、この方法によれば担体表面に固定化された核酸を短時間で、簡便かつ高感度に定量することが可能となる。核酸由来の酸化還元電流としては、アデニン、チミン、グアニンもしくはシトシンに由来する酸化還元電流を利用することができる。

【0083】本発明の遺伝子検出法においては、核酸プローブを溶解した溶液に試料核酸固定化電極あるいは試料核酸固定化光ファイバーを挿入し、37~72℃の範囲でハイブリダイゼーション反応を行なう。ハイブリダイゼーション反応の最適温度は、用いるプローブの塩基配列、長さ等により異なる。

【0084】この場合のハイブリダイゼーション反応は固相での反応であるため、溶液中における反応よりも反応速度でやや劣る。しかしながら、試料核酸固定化電極を用いる場合には、ハイブリダイゼーション反応前および/または反応時に電極表面に電位を印加しておくことによりハイブリダイゼーション反応を促進することができ、この問題を解決することが可能である。印加する電圧はプラス電位のみであるか、あるいはプラス電位とマイナス電位とを交互に印加することが好ましく、連続的に、もしくはパルスのように断続的に印加する。また、印加する電位は、一定電位でも、サイクリックボルタメトリーのような可変電位でもよく、好ましくは0~±2.0V、より好ましくは0~1.0V (vs. SCE) のプラス電位である。

【0085】ハイブリダイゼーションの際に、試料核酸に結合した核酸プローブの他に、未反応の核酸が非特異的に電極表面に吸着することがある。これは、遺伝子検出のS/N比を劣化させる要因となる。核酸は、通常マイナスに荷電しているため、ハイブリダイゼーション終了後、電極にマイナスの電化を印加することにより非特異的に吸着している核酸を除去することができる。この際印加する電位は、0~2.0V、好ましくは0~1.5Vであることが好ましい。

【0086】二本鎖認識体は、ハイブリダイゼーション反応前に検体試料中に添加することもできるし、反応後に添加することもできる。また、予め二本鎖認識体の溶液を調製しておき、ハイブリダイゼーション終了後、核酸プローブ固定化電極または光ファイバーをこの溶液に挿入してもよい。二本鎖認識体にはプラスに荷電している物質が多いので、担体が電極である場合には、プラスの電位を印加することにより担体への二本鎖認識体の非

特異的な吸着を抑制することができる。

【0087】電極反応は電極表面においてしか起こらないことから、ハイブリダイゼーションした場合にのみ、二本鎖核酸に結合した挿入剤の電極応答が得られる。試料核酸固定化電極を用いた場合には、ポテンシostat、ファンクションジェネレータ、レコーダからなる測定システムを用いる。電位を挿入剤の酸化還元電位前後に設定し電位を走査する。このとき、酸化還元電流を測定し検出遺伝子の定量を行なう。この電気化学的測定は、被検溶液中または他の電解液中の何れで行なっても良い。また、親水性溶媒中または疎水性溶媒中に行なってもよい。

【0088】試料核酸固定化光ファイバーを用いた場合には吸光度、発光、蛍光、反射光、消光、円偏光二色性、蛍光偏光などの光学的情報を測定することで検出遺伝子の定量を行なう。

【0089】上記検出方法においては、安全性および簡便性に優れ、かつ短時間で目的とする遺伝子の有無を高感度に検出することができる遺伝子検出法を提供することを目的として、挿入剤が発する電気化学的もしくは光学的な信号を検出することができる電極、光ファイバー等の担体に試料核酸を固定化して用いている。この目的は、試料核酸固定化電極もしくは試料核酸固定化光ファイバーの代わりに、試料核酸を粒子表面に固定化した試料核酸固定化粒子を用いることによっても達成される。すなわち、粒子表面において試料核酸と核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより二本鎖核酸を形成し、これに電気化学的もしくは光学的に活性な二本鎖認識体を結合させて、検出器により二本鎖認識体を電気化学的もしくは光学的に検出すればよい。

【0090】試料核酸を固定化する粒子は特に限定されるものではなく、例えば、ラテックスビーズ、ポリスチレンビーズ、ガラスビーズ、磁性体粒子等を挙げることができる。また、用いる粒子の直径は、100Å（オングストローム）ないし1mm程度の範囲にあることが好ましい。

【0091】その他の条件は、上記試料核酸固定化電極もしくは光ファイバーを用いる場合の条件をそのまま適用することができる。

【0092】同様に、フィルター表面に試料核酸を固定化した試料核酸固定化フィルターを用いて遺伝子の検出を行なうこともできる。この際用いられるフィルターは、少なくとも100℃の温度で変性しない材質のものであれば特に限定されるものではなく、例えば、ニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターのようなDNAのサザンブロッティングに通常用いられるフィルターを使用することができる。このフィルターへの試料核酸の固定化には、担体への試料核酸の固定化方法として上に説明した方法をそのまま適用することができる。

【0093】試料核酸固定化フィルターを用いた遺伝子

の検出は、次のようにして行なうことができる。

【0094】まず、末梢静脈血、各種臓器細胞等の検体試料から従来法に準じて核酸を抽出し、必要であれば精製する。得られた試料核酸はフィルターに固定化し、この試料核酸固定化フィルターを含む複数のフィルターからなる多層構造のフィルター装置を作製する。次に、核酸プローブを含有するハイブリダイゼーション反応液を調製し、この反応液をフィルター装置に添加し、核酸プローブをフィルター装置内部に浸透させる。このハイブリダイゼーション反応液中には、予め二本鎖認識体、特に直接もしくは間接的な光学活性を有する二本鎖認識体を含有させておく。反応液が十分に浸透した後、37〜72℃で加熱して核酸プローブとフィルター表面上に固定化された試料核酸とのハイブリダイゼーションを行なう。反応後、フィルター装置から核酸プローブ固定化フィルターを取り外し、洗浄する。核酸試料中に目的とする遺伝子が存在する場合には、試料核酸固定化フィルター上に二本鎖が形成され、この二本鎖核酸に二本鎖認識体が結合している。この二本鎖認識体起因する信号の変化を測定することにより目的遺伝子の定量を行なう。すなわち、二本鎖認識体が光学活性を有している場合には、発光、蛍光、反射光、蛍光偏光、消光、円偏光二色性等の光学的な信号の変化を測定すればよい。

【0095】本発明の遺伝子検出法は、その表面上に試料核酸を固定化するための、電極および光ファイバからなる群より選ばれる担体と、担体を移動させるための移動手段と、一本鎖に変性された試料核酸を含有する試料溶液を貯留し、担体表面上に試料核酸を固定化するための固定化槽と、核酸プローブを含有するプローブ溶液を貯留し、担体表面に固定化された試料核酸と核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより担体上に二本鎖核酸を形成するための反応槽と、プローブ溶液の温度を制御する温度制御手段と、核酸プローブとのハイブリダイゼーションの後、担体を洗浄して未反応の核酸プローブを除去するための洗浄手段と、二本鎖認識体を含有する溶液を貯留し、二本鎖認識体と担体表面上に形成された二本鎖核酸とを反応させることにより二本鎖認識体を二本鎖核酸に結合させ、結合した二本鎖認識体が生ずる電気化学的もしくは光学的な信号を検出するための検出槽とを具備する遺伝子検出装置により、パッチ処理的に、もしくは全自動的に実施することが可能である。

【0096】上記遺伝子検出装置においては、固定化槽には一本鎖に変性された試料核酸を含有する試料溶液が貯留される。この試料溶液としては、被検細胞を破碎した後の核酸粗抽出液をそのままか、あるいはこの核酸粗抽出液を精製した精製核酸抽出液を用いればよい。このような核酸粗抽出液もしくは精製核酸抽出液を調製することができる試料溶液調製装置を固定化槽に連結し、被検細胞からその場で調製した試料溶液を固定化槽に送ることもでき、その結果、被検細胞からの遺伝子の検出を

全自動的に行なうことが可能となる。試料溶液調製装置は、例えばディスポーザブルなカートリッジタイプとし、測定終了後に新しいカートリッジに交換するようにしてもよい。着脱自在なカートリッジタイプを採用することにより、洗浄の手間をかけることなく、常に清浄な状態で試料溶液を調製することが可能となる。

【0097】上記遺伝子検出装置は、さらに、担体表面上に形成された二本鎖核酸を担体表面から脱着して担体を再生するための脱着手段を具備することができる。このような脱着手段を有することにより、担体を繰り返し使用することが可能となり、検出装置を自動化する上で非常に望ましい。上記遺伝子検出装置において用いることができる脱着手段としては、クロロホルム等の比誘電率の低い物質、ヨウ化カリウム等のカオトロピック剤、または界面活性剤で処理する方法が挙げられる。この際、加熱することにより短時間に試料核酸を脱着することができる。また、DNase、RNaseのようなヌクレアーゼを用いて担体から試料核酸を除去することもできる。

【0098】また、上記遺伝子検出装置においては、複数の担体を用いることもできる。

【0099】次に、本発明の遺伝子検出法を用いた自動遺伝子検出装置を図面を参照して説明する。

【0100】図1は、本発明による遺伝子検出法を利用した自動遺伝子検出装置の一具体例を模式的に示す図である。この装置は、固定化槽2、反応槽4、検出槽10および脱着処理槽12の4種類の槽を有している。固定化槽2は廃液タンク11に接続され、移動レール3に沿って水平方向に移動可能となっていて移動レール3上の所定の位置において試料核酸精製装置1と接続する。この固定化槽2においては、担体6への試料核酸の固定化が行なわれる。反応槽4は温度コントローラ5に嵌合されている。担体6は、移動装置13に固定されており、この移動装置13により各槽上方の所定の位置への水平移動および各槽の内部への上下移動が行なわれる。担体6としては電極もしくは光ファイバが用いられており、これにより検出された電気信号は、電気信号検出制御装置7を介して計算機8に入力され、信号の解析が行なわれる。

【0101】次に、この装置を用いた遺伝子検出方法について説明する。まず、検出しようとする核酸を含む被検細胞を試料核酸精製装置1に入れ、一本鎖に変性された試料核酸を含有する試料溶液を調製する。調製した試料溶液を固定化槽2に送り、その後、固定化槽2を、移動レール3上を所定の位置まで移動させる。次に、担体6を固定化槽2の上方に水平移動させた後、固定化槽2内に移動させる。担体6を固定化槽2内の試料溶液中に浸漬させて担体6の表面上に試料核酸を吸着させた後、担体6を固定化槽2から引き上げ、反応槽4の上方に水平移動させる。担体6を引き上げた後の固定化槽2は、再び試料核酸精製装置1に接続する位置に移動させ、内

部に貯留する試料溶液を廃液タンク11に排出させる。反応槽4の上方に移動させた担体6は、次に反応槽4内に移動させる。反応槽4には予め核酸プローブが貯留されており、この反応槽4において担体6上に固定化された試料核酸と核酸プローブとのハイブリダイゼーションを行なう。この際、温度コントローラ5によりプローブ溶液を適温に制御して反応を促進させる。反応終了後、担体6をプローブ溶液から引き上げ、洗浄液タンク9から送られる洗浄液によって洗浄して未反応の核酸プローブを除去した後、検出槽10の上方に水平移動させる。検出槽10上に移動させた遺伝子センサ5は、次いで検出槽9内部に移動させる。検出槽10の内部には二本鎖認識体を含有する溶液が貯留されており、この二本鎖認識体が、溶液中に浸漬した担体6の表面に形成された二本鎖核酸を認識して結合する。結合した二本鎖認識体が発する電気化学的信号は、担体6により検出され、電気信号検出制御装置7により制御された後計算機8に入力されて解析される。測定後、担体6を検出槽10から引き上げ、脱着処理槽12内部に移動させる。脱着処理槽12では、担体6の表面上に形成された二本鎖の脱着が行なわれ、担体6が再生される。

【0102】前述の反応槽4は必ずしも単一の槽に限られるものではなく、図2に示すように、複数の小槽13を組み合わせたものを用いることができる。このような反応槽と複数の担体6を用いることにより、複数のサンプルを同時に測定することが可能となる。また、この際、それぞれ独立した、小槽13と同数の試料核酸精製装置1を組み合わせて複数のサンプルを同時に調製することにより、より効率よく測定を行なうことができる。

【0103】また、未反応の核酸サンプルおよび二本鎖認識体を除去することなく測定を行なうことも可能である。その際には、洗浄液タンク9および検出槽10は必要なく、反応槽4中で測定を行なうことが可能である。

【0104】さらに、反応槽4は、試料核酸固定化担体を備えたディスポーザブルな反応セルとすることもできる。この反応セルは、その内部底面もしくは側面に試料核酸固定化担体を備えている。ここで用いられる固定化担体としては、上述のいずれの固定化担体をも使用することができるが、検出装置本体との接続を考慮すると、試料核酸固定化電極であることが好ましい。固定化担体は、反応セルから分離可能であるように設置し、繰り返し用いるようにしてもよい。

【0105】この反応セルを用いた遺伝子の検出は次の通りに行なう。まず、前述の方法に従い反応セル内の担体に試料核酸を固定化する。次に、核酸プローブを含有する溶液を反応セル内に入れ、用いるプローブに応じた温度でアニリングを行なって二本鎖を形成させた後、二本鎖認識体を添加し、それにより直接もしくは間接的に発生する信号を反応セルに設けられた担体を通して測定する。この場合には、反応セル自体が試料核酸固定化

担体を備えているので、別に担体を使用する必要はない。

【0106】この反応セルは、1回の測定を終える度に検出装置より取り外して廃棄する。したがって、サンプル同志のクロスコンタミネーション、キャリーオーバー等のない信頼性の高い遺伝子の検出が可能となる。また、反応セルを洗浄する必要がないので、より簡便に短時間で測定を行なうことができる。

【0107】反応槽4の温度を制御する温度コントローラ5は、図3に示すように、恒温槽21、この恒温槽21の温度を制御するコントローラ22および試料溶液の温度を測定する温度センサ23を具備している。図3において、恒温槽21内に設置された反応槽4は、上記の複数の小槽13を組み合わせたものである。複数の小槽13のうちの1つには、プローブ溶液と同じ組成を有する緩衝液が入れられ、その液中に温度センサ23が挿入される。この緩衝液の温度がプローブ溶液の温度として測定される。温度センサ23はコントローラ22に接続しており、反応槽4内の緩衝液の温度を測定してその情報をコントローラ22に送る。温度センサ23からの温度情報を受け取ったコントローラ22は、その情報を演算処理し、プローブ溶液が常に所定の温度を保つように恒温槽21の温度を制御する。この温度制御は、 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の範囲で行なわれることが好ましい。

【0108】次に、電気化学発光を利用する遺伝子検出装置の例を説明する。

【0109】図4は、電気化学発光を利用する遺伝子検出装置を模式的に示す図である。この装置は、図1に示す検出装置における固定化槽、反応槽および検出槽の各機能を兼ね備えた反応セル33と、洗浄槽43とを有している。上述のように、電気化学発光を利用する場合には、未反応の核酸プローブおよび未反応の挿入剤を除去することなく測定を行なうことができるので、独立した反応槽および検出槽を具備する必要はない。反応セル33の底面には試料核酸を固定化するための電極34が設けられている。また、反応セル33は、図1に示す検出装置の反応槽と同様に温度コントローラ35に嵌合されている。さらに、反応セル33は移動レール36により水平方向に移動可能であり、この移動レール36上の所定の位置において試料核酸精製装置31および核酸プローブ供給装置32に接続する。参照電極37は光ファイバ38の端部と共に、移動装置44に固定されている。この移動装置44により、参照電極37および光ファイバ38の各槽上方への水平移動および各槽内部への上下移動が行なわれる。参照電極37は、試料核酸固定化用電極34と共にファンクションジェネレータ/ポテンショスタット39に接続されている。これらの電極間に印加する電圧の制御は、計算機40により行なう。試料核酸固定化用電極34の表面で生じた電気化学発光は、光ファイバ38を介してフォトマル41に送られて増幅さ

れ、光子カウンタ42で計測される。測定結果は計算機40に入力され、解析される。

【0110】この装置を用いた遺伝子の検出は、次のように行なう。まず、上述の図1に示す装置の場合と同様に、検出しようとする核酸を含む被検細胞を試料核酸精製装置31に入れて一本鎖に変性された試料核酸を含有する試料溶液を調製し、これを反応セル33に移して固定化用電極34表面上に試料核酸を固定化する。試料核酸の固定化が終了した後、試料溶液は廃棄する。次に、反応セル33を、核酸プローブ供給装置に接続する位置まで移動レール36上を移動させ、核酸プローブを含むプローブ溶液をセル33内に導入する。その後、温度コントローラ35によりプローブ溶液を適温に制御して、試料核酸固定化電極34の表面に固定されている試料核酸とプローブ溶液中の核酸プローブとのハイブリダイゼーションを行なう。この際、プローブ溶液中に、電気化学発光を生ずる挿入剤を添加する。挿入剤は、予めプローブ溶液中に添加しておくこともできる。次いで、移動レール36を用いて反応セル33を所定の位置まで移動させ、さらに、反応セル33の内部に参照電極37および光ファイバ38を移動させてプローブ溶液中に浸漬する。その後、参照電極37と反応セル33内に設けられた試料核酸固定化電極34との間に印加し、電気化学発光を行なう。電気化学発光により生じた光は光ファイバ38を介してフォトマル41に導き、増幅した後光子カウンタ42において計測する。計測の結果は計算機40に入力し、解析する。測定後、参照電極37および光ファイバ38を反応セル33から引き上げ、洗浄槽43に移動して洗浄する。試料核酸固定化電極34は、測定終了後、上記と同様の方法により表面に固定化されている試料核酸を脱着し、再生する。

【0111】以上詳述したように、本発明による自動遺伝子検出装置を用いることにより、上記方法による遺伝子検出を自動的に行なうことができる。したがって、より簡便かつ短時間に遺伝子の検出を行なうことができる。

【0112】以上試料核酸を担体に固定化した場合の遺伝子検出法について説明してきたが、本発明の方法において、更に、試料核酸を固定化するかわりに核酸プローブを固定化することも可能である。特にプローブを固定化する場合は、少なくとも2種類以上の核酸プローブを同時に固定化した担体を用いることで、一度に複数の遺伝子を検出可能となるため、更に応用範囲が広がる。以下にその応用例を説明する。

【0113】まず第一に、少なくとも2種類以上の核酸プローブをそれぞれ固定化した複数の核酸プローブ固定化遺伝子検出用センサを用いることでより好適な核酸プローブを選択することができる。

【0114】ここで核酸プローブ固定化遺伝子検出用センサは、電気化学的或いは光学的信号を検出可能な担体

に核酸プローブを固定化したものをいい、例えば、核酸プローブ固定化電極、核酸プローブ固定化光ファイバー等が挙げられる。

【0115】複数個の遺伝子検出用センサの各々にプローブ候補となる複数種の核酸プローブを固定化し、このセンサに固定化された核酸プローブと試料核酸とをハイブリダイゼーションさせた後、センサから得られる信号の大きさを比較して、試料核酸に対してより親和性の高い核酸プローブを選択することができる。

【0116】また、温度が高いほど二本鎖の核酸が解離しやすいという性質を利用して、異なる温度でハイブリダイゼーションを行い、より高温で信号が多く得られるものを選択することによってより好適な核酸プローブを選択することができる。特に、ハイブリダイゼーションを行うための反応容器に温度制御装置等を用いて温度勾配をつけ、図8に示すように温度勾配方向に同配列の核酸プローブ、そしてこれと垂直方向に異配列の核酸プローブを配置したセンサを用いてハイブリダイゼーション反応を行うことにより、異なる温度での反応性を同時に測定でき、容易に核酸プローブを選択することが可能となる。

【0117】また第二に、少なくとも2種類以上の核酸プローブが固定化されたマス目状の核酸プローブ固定化基板を用いることで簡便かつ短時間の遺伝子検出が可能になり、またこの基板を用いて遺伝子の塩基配列を決定することもできる。

【0118】ここで核酸プローブ固定化基板は、信号検出可能な担体を行と列に分割してマス目をつけ、各マス目に異なる配列の核酸プローブを固定化することによって作成された基板である。当該基板の具体的な一例を図11に示す。信号検出可能な担体としては、電極、光ファイバー、水晶振動子、半導体素子等、それ自体が信号検出可能な担体の他に、ニトロセルロース膜、ナイロン膜等、或いはマイクロタイタープレートなども用いることが可能である。但し、これらを担体として用いる場合には、作成された基板の裏面に信号を検出することが可能な構造を接続する。この基板につけられたマス目は規則正しく一定間隔で区切られた単独構造であり、他からは汚染されることがなく、行と列の数は特に制限されない。また、プローブを固定化する個々の担体を複数組み合わせることで1つの素子を形成することもできる。

【0119】この基板上に固定化されている核酸プローブと試料核酸とをハイブリダイゼーション反応させると、基板上の各マス目にはこの反応に関してポジティブなものやネガティブものが現れる。このように複数の遺伝子を同時に検査することができ、特にどのマス目がどの塩基配列に対応するかがあらかじめ分かっているれば、ポジティブに反応した塩基配列を計算機処理するだけで試料核酸の配列が決定できる。

【0120】この遺伝子検査法又は核酸配列決定法を実

施するためには、図1に示す本発明の遺伝子検出装置を応用することが可能である。具体的には、図1の装置において、試料核酸調製装置1を直接反応槽4に接続し、担体6として核酸プローブ固定化基板を用い、脱着処理槽12を、核酸プローブ固定化基板から試料核酸を解離するための解離処理槽とすることで実施することができる。

【0121】すなわち、この遺伝子検出法は、信号検出可能な担体の表面上に核酸プローブを固定化した核酸プローブ固定化基板と、核酸プローブ固定化基板を移動させるための移動手段と、一本鎖に変性された試料核酸を含有する試料溶液を貯留し、試料核酸と核酸プローブ固定化基板の表面に固定化された核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより核酸プローブ固定化基板上に二本鎖核酸を形成するための反応槽と、試料溶液の温度を制御する温度制御手段と、試料核酸とのハイブリダイゼーションの後、核酸プローブ固定化基板を洗浄して未反応の試料核酸を除去するための洗浄手段と、二本鎖認識体を含有する溶液を貯留し、二本鎖認識体と核酸プローブ固定化基板表面上に形成された二本鎖核酸とを反応させることにより二本鎖認識体を二本鎖核酸に結合させ、結合した二本鎖認識体が生ずる電気化学的もしくは光学的な信号を検出するための検出槽を具備する自動遺伝子検査装置により実施可能である。

【0122】また、図4において、試料核酸精製装置31、反応セル33、ファンクションジェネレータ/ポテンシostat39及び計算機40以外のものを除去し、反応セル33の底面に設置された試料核酸固定化電極34を核酸プローブ固定化基板に変えた装置を用いることも可能である。

【0123】更に核酸配列決定法は、上記自動遺伝子検査装置における計算機に、更に検査結果を数値解析する機能を持たせた自動遺伝子配列検査装置により実施可能である。

【0124】

【実施例】

実施例1：試料核酸固定化電極を用いた遺伝子の検出

a. 試料核酸固定化電極の調製

遺伝子検出のモデルとして、検体試料にpUC 119のPst Iサイトに発座遺伝子v-myc断片を挿入したpVM 623を用い、また核酸プローブにv-mycに相補的な合成オリゴヌクレオチド(20mer)を用いた。電極にはペーサルブレインバイロリティックグラファイト(BPPG)を用い、次の手順により試料核酸の固定化を行なった。

【0125】まず、pVM 623をHind IIIで消化することによりリニアにし、次いで98℃で熱変性して試料核酸溶液を作製した。次に、電極表面を研磨したBPPG電極を上記試料核酸溶液に挿入し、0.1Vの電位を印加しながら核酸を吸着固定した。試料核酸の固定化は使

用直前に行ない、作製した試料核酸固定化電極は使用するまで4℃で保存した。

【0126】b. 試料核酸固定化電極を用いた遺伝子の検出

以下の手順により遺伝子の検出を行なった。

【0127】まず、上で作製した試料核酸固定化電極を核酸プローブを含有する溶液中に挿入し、42℃でインキュベートしてハイブリダイゼーション反応を行なった。この際、電極に断続的に0.1V (vs. SCE)の電位を印加することにより反応の促進を図った。反応終了後、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電極活性の高い挿入剤であるアクリジンオレンジを添加した。アクリジンオレンジが二本鎖核酸に結合した後、電極にマイナス電位を印加して非特異的に吸着している物質を電極表面から除去した。その後、挿入剤の酸化還元電流をBPPG電極を介して測定し、検体試料中に含まれるv-mycの定量を行なった。

【0128】その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。また、全ての操作を1時間以内に自動的に行なうことが可能であった。

【0129】実施例2：試料核酸固定化光ファイバを用いた遺伝子の検出

a. 試料核酸固定化電極の調製

遺伝子検出のモデルとして、検体試料にpUC 119のPst Iサイトに発癌遺伝子v-myc断片を挿入したpVM 623を用い、また核酸プローブにv-mycに相補的な合成オリゴヌクレオチド(20mer)を用いた。試料核酸の光ファイバへの固定化は次の手順により行なった。

【0130】まず、pVM 623をHind IIIで消化することによりリニアにし、次いで98℃で熱変性して試料核酸溶液を作製した。次に、シラン剤(γ-APTES)およびグルタルアルデヒドで処理した光ファイバを上記試料核酸溶液に浸漬することにより核酸を吸着固定した。試料核酸の固定化は使用直前に行ない、作製した試料核酸固定化電極は使用するまで4℃で保存した。

【0131】b. 試料核酸固定化光ファイバを用いた遺伝子の検出

以下の手順により遺伝子の検出を行なった。

【0132】まず、上で作製した試料核酸固定化光ファイバを核酸プローブを含有する溶液中に挿入し、42℃でインキュベートしてハイブリダイゼーション反応を行なった。この際、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ光学活性の高い挿入剤であるアクリジンオレンジを添加した。アクリジンオレンジが二本鎖核酸に結合した後、アクリジンオレンジが生じる蛍光を光ファイバを介して測定し、検体試料中に含まれるv-mycの定量を行なった。

【0133】その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。また、全ての操作を1時間以内に

自動的に行なうことが可能であった。

【0134】実施例3：試料核酸固定化電極を用いた遺伝子の検出

a. 試料核酸固定化電極の調製

遺伝子検出のモデルとして、検体試料にpUC 119のPst Iサイトに発癌遺伝子v-myc断片を挿入したpVM 623を用いた。また、核酸プローブとしては、v-mycに相補的な配列を有する合成オリゴヌクレオチド(20mer)の3'-末端にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入し、さらにこのアミノ基にグルタルアルデヒドを介してアミノアクリジンを結合したものをを用いた。BPPG電極への試料核酸の固定化は次の手順により行なった。

【0135】まず、pVM 623をHind IIIで消化することによりリニアにし、次いで98℃で熱変性して試料核酸溶液を作製した。次に、電極表面を研磨したBPPG電極を上記試料核酸溶液に挿入し、0.1Vの電位を印加しながら核酸を吸着固定した。試料核酸の固定化は使用直前に行ない、作製した試料核酸固定化電極は使用するまで4℃で保存した。

【0136】b. 試料核酸固定化電極を用いた遺伝子の検出

以下の手順により遺伝子の検出を行なった。

【0137】まず、上で作製した試料核酸固定化電極を核酸プローブを含有する溶液中に挿入し、42℃でインキュベートしてハイブリダイゼーション反応を行なった。この際、電極に断続的に0.1V (vs. SCE)の電位を印加することにより反応の促進を図った。反応終了後、核酸プローブに標識したアミノアクリジンに由来する酸化還元電流を測定した。

【0138】その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。また、全ての操作を1時間以内に自動的に行なうことが可能であった。

【0139】実施例4：試料核酸固定化光ファイバを用いた遺伝子の検出

a. 試料核酸固定化電極の調製

遺伝子検出のモデルとして、検体試料にpUC 119のPst Iサイトに発癌遺伝子v-myc断片を挿入したpVM 623を用いた。また、核酸プローブとしては、v-mycに相補的な配列を有する合成オリゴヌクレオチド(20mer)の3'-末端にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入し、さらにこのアミノ基にグルタルアルデヒドを介してアミノアクリジンを結合したものをを用いた。試料核酸の光ファイバへの固定化は次の手順により行なった。

【0140】まず、pVM 623をHind IIIで消化することによりリニアにし、次いで98℃で熱変性して試料核酸溶液を作製した。次に、シラン剤(γ-APTES

S) およびグルタルアルデヒドで処理した光ファイバを上記試料核酸溶液に浸漬することにより核酸を吸着固定した。試料核酸の固定化は使用直前に行ない、作製した試料核酸固定化電極は使用するまで4℃で保存した。

【0141】b. 試料核酸固定化光ファイバを用いた遺伝子の検出

以下の手順により遺伝子の検出を行なった。

【0142】まず、上で作製した試料核酸固定化光ファイバを核酸プローブを含有する溶液中に挿入し、42℃でインキュベートしてハイブリダイゼーション反応を行なった。反応終了後、核酸プローブに標識したアミノアクリジンに由来する蛍光を光ファイバを介して測定し、検体試料中に含まれるv-mycの定量を行なった。

【0143】その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。また、全ての操作を1時間以内に自動的に行なうことが可能であった。

【0144】実施例5：試料核酸固定化電極を用いたRFLP解析

RFLP解析のモデルとして、家族性アミロイドポリニューロパチー (Familial Amyloidotic Polyneuropathy; FAP) の遺伝子診断を行った。

【0145】FAPはトランスサイレチン (TTR) 遺伝子の30番目のバリンの遺伝子コードGTGがATGに変わり、アミノ酸がメチオニンに変化してしまうことが原因となる遺伝病である(図5参照)。この塩基置換により新たに制限酵素BamI及びNsiIの切断部位が形成されるため(図6参照)、TTR遺伝子がBamI又はNsiIにより切断されるかどうかでFAPの遺伝子診断が可能である。以下にその解析例を示す。a. 試料核酸固定化電極の調製

FAP患者及び健常者からヘパリン採血した1mlの血液に等量の3%デキストラン、0.9%塩化ナトリウムを加え、白血球を分離し、Triton X-100溶液を用いて細胞膜を破壊した。これに高濃度NaI溶液及びDNA吸着ビーズを加えてゲノムDNAをビーズに吸着させた。遠心分離でビーズを回収して50%エタノールを含む洗浄液(0.8M NaCl, 40mM Tris-HCl, 4mM EDTA (pH7.5))で洗浄した後、少量の水を加え50℃でビーズからDNAを溶出した。得られたゲノムDNAを定法に従い制限酵素BamIで切断した。切断処理後のDNAを0.7%アガロース電気泳動で分離し、ゲルの末端から溶出されるDNAを1分ごとに緩衝液中に採取した。採取したDNAを100℃で5分加熱し、一本鎖に解離させた後、100℃のままそれぞれにBPPG電極を浸漬し、試料DNAを吸着固定した。

【0146】b. 試料核酸固定化電極を用いたRFLP解析

プローブとして、TTR遺伝子のcDNAのHaeII断片(0.3Kb)を用いて以下の手順により解析を行

った。

【0147】プローブを2×SSC緩衝液(0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸ナトリウム)に溶解し、分子量分画した試料DNA固定化電極と40℃で1時間ハイブリダイゼーションを行った。反応終了後、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電極活性の高い挿入剤であるドーノマイシンを最終濃度10μMとなるように加え、5分間インターカレーションを行った。インターカレーションの後、銀塩化銀電極を参照極、白金板を対極、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)を電解質として、ドーノマイシンの電気化学的反応をリニアスイープボルタメトリー(25℃、25mV/sec)を用いて測定した。本条件において、ドーノマイシンは、一本鎖のままなら490mV付近に、二本鎖を形成すると520mV付近に酸化電流のピークが得られる。酸化電流のピークが500mVを超えるものについて、FAP患者及び健常者の試料を解析すると、溶出時間35分前後、及び58分前後には共通にシグナルが得られるものの、FAP患者には更に特徴的に28分前後及び44分前後にシグナルが得られた。35分、58分に得られたシグナルはそれぞれ2.3Kb、5.2Kbに対応し、これは今回用いたプローブに対する正常なTTR遺伝子のBamI断片である。またFAP患者に特徴的に得られた28分、44分のシグナルはそれぞれ3.65Kb、1.55Kbに対応し、これは5.2Kb断片が一塩基置換されたためにBamIより新たに形成されたものである。本FAP患者の試料からは正常、異常の2つのシグナルが得られたことから、正常なTTR遺伝子と変異を起こしたTTR遺伝子を両方持っていることが分かる(FAPは常染色体優性遺伝による疾患であるので、一方の遺伝子異常があると発病する)。なお、採血から最終結果を得るまでにおおよそ4時間を要した。このことから従来法(2~3日)に比べ、著しく時間を短縮することができたことがわかる。

【0148】以上示したように、試料核酸を分子量ごとに固定化した電極を用いることでFAPの遺伝子診断が容易に行えるようになった。

【0149】実施例6：試料核酸固定化テーパー状電極を用いたRFLP解析

a. 試料核酸固定化電極の調製

FAP患者及び健常者からヘパリン採血した1mlの血液に等量の3%デキストラン、0.9%塩化ナトリウムを加え、白血球を分離し、Triton X-100溶液を用いて細胞膜を破壊した。これに高濃度NaI溶液及びDNA吸着ビーズを加えてゲノムDNAをビーズに吸着させた。遠心分離でビーズを回収して50%エタノールを含む洗浄液(0.8M NaCl, 40mM Tris-HCl, 4mM EDTA (pH7.5))で洗浄し、少量の水を加え50℃でビーズからDNAを溶出した。得られたゲノムDNAを定法に従い制限酵素Ba

IIで切断した。切断処理後のDNAをキャピラリー電気泳動で分離し、カラムの末端から溶出されるDNAを含む緩衝液を、100℃に加熱して一本鎖に解離させながら、テープ状BPPG電極(5mm幅で断線されている)に吸着固定した。この際テープ状BPPG電極は、5mm/mlnの速さで水平方向に移動させた。電気泳動は30分行い、電極の長さは全体で15cmとなった。これによりゲル電気泳動後一本鎖にした遺伝子をトランスファーしたフィルターに相当するものが作成できたことになり、テープの移動距離は分子量に対応する。先端からの移動距離の短いものは低分子量、長いものは高分子量に対応する。

【0150】b. 試料核酸固定化電極を用いたRFLP解析

プローブとして、TTR遺伝子のcDNAのHaeII断片(0.3Kb)を用いて以下の手順により解析を行った。プローブを2×SSC緩衝液(0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸ナトリウム)に溶解し、分子量分画した試料核酸固定化テープ状電極と40℃で1時間ハイブリダイゼーションを行った。反応終了後、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電極活性の高い挿入剤であるドーノマイシンを最終濃度10μMとなるように加え、5分間インターカレーションを行った。インターカレーション後、銀塩化銀電極を参照極、白金板を対極、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)を電解質として、ドーノマイシンの電気化学的反応をリニアスイープボルタンメトリー(25℃、25mV/sec)を用いて測定した。本条件においてドーノマイシンは、一本鎖のままなら490mV付近に、二本鎖を形成すると520mV付近に酸化電流のピークが得られる。酸化電流のピークが500mVを越えるものについて、FAP患者及び健康者の試料を解析すると、テープの移動距離8cm前後及び14cm前後は共通にシグナルが得られるものの、FAP患者には更に特徴的に6.5cm前後及び11cm前後にシグナルが得られた。8cm、14cmはそれぞれ2.3Kb、5.2Kbに対応し、これらは今回用いたプローブに対する正常なTTR遺伝子のBaeII断片である。またFAP患者に特徴的に得られた6.5cm、11cmのシグナルはそれぞれ3.65Kb、1.55Kbに対応し、これらは5.2Kb断片が一塩基置換のためBaeIIにより新たに形成されたものである。本FAP患者の試料からは正常、異常の2つのシグナルが得られたことから、正常なTTR遺伝子と変異を起こしたTTR遺伝子を両方持っていることが分かる(FAPは常染色体優性遺伝による疾患であるので、一方の遺伝子に異常があると発病する)。なお、採血から最終結果を得るまでにおよそ4時間を要した。このことから従来法(2~3日)に比べ、著しく時間を短縮することができたことがわかる。

【0151】以上示したように、試料核酸を分子量ごと

に固定化したテープ状電極を用いることでFAPの遺伝子診断が容易に行えるようになった。

【0152】実施例7:ハイブリダイゼーション反応の経時的測定

a. 核酸プローブ固定化電極の調製

ハイブリダイゼーション反応の経時的測定のモデルとして、検体試料にpVM623(pUC119にv-mycを組み込んだもの)を用い、また核酸プローブにv-mycの一部に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いた。電極にはBPPG(Basal Plane Pyrolytic Graphite)電極を用いて、次の手順により核酸プローブの固定化を行った。

【0153】まず、DNAシンセサイザー(アプライド・バイオシステム社製)で配列表の配列番号3に示す5'-TGCA GTTCCGGTGGCTGATC3'配列の核酸プローブを合成した。これをNAPカラム(ファルマシア社製)で精製した後、1mM Tris-HCl(pH8.0)(1M NaCl含む)中に10μg/mlになるように溶解し核酸プローブ溶液を作製した。この溶液にBPPG電極を浸漬して、100℃で30分間核酸プローブを吸着させた。リニア・スイープ・ボルタンメトリー(参照電極:Ag/AgCl、対極:Pt、電解質:1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0))で1V付近で得られるグアニン残基由来の酸化電流により、核酸プローブが固定化されているか否かを確認をした。

【0154】b. ハイブリダイゼーション反応の経時的測定

以下の手順により経時的にハイブリダイゼーション反応の進行状態を測定した。

【0155】まず、制限酵素HindIIIで消化することによりリニアにした1μg/mlのpVM623と、プローブ固定化電極とを2×SSC緩衝液(0.3M NaCl、30mMクエン酸三ナトリウム)中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション開始後、15分、30分、1時間、2時間、4時間、18時間(オーバーナイト)後に、挿入剤であるアクリジンオレンジを作用させ、リニア・スイープ・ボルタンメトリーでアクリジンオレンジの酸化電流、及びその電位値を測定した。なお、対照として大腸菌HB101の染色体DNA(1μg/ml)を用いて同様の実験を行った。結果として得られた電流値の経時変化を図7に示す。

【0156】図7から、本モデル実験においては、ハイブリダイゼーションは反応開始後15分でも十分検出可能であり、通常行われているオーバーナイトの反応は全く必要ないことが分かった。

【0157】このように核酸プローブ固定化遺伝子検出用センサ(この場合は電極)を用いることでハイブリダイゼーション反応をモニタリングすることができ、反応時間を大幅に短縮することが可能となった。

【0158】実施例8：核酸プローブ固定化電極を用いた核酸プローブの選択

成人T細胞白血病(ATL)はレトロウイルスであるHuman T-Cell Lymphotropic Virus(HTLV)の感染により引き起こされる感染症である。従って、HTLV遺伝子の有無を検出することで遺伝子診断が可能となる。この遺伝子診断にふさわしいと思われる核酸プローブ候補を、HTLV-1遺伝子のデータベースから、分子内二次構造をとりなく、比較的GC含量が多いということを指標として検索し、配列表の配列番号4~13に示す10種類のプローブを選択した。

【0159】a. 核酸プローブ固定化電極の調製

前記10種類のプローブを1mM Tris-HCl (pH 8.5) 1M NaCl溶液に溶解し、各核酸プローブ溶液にBPG電極を浸漬して100℃で30分間吸着処理を行った。サイクリックボルタンメトリーで1V付近に得られるDNA中のグアニン残基由来の酸化電流を測定することで吸着固定の確認を行った。

【0160】b. 核酸プローブ固定化電極を用いた核酸プローブの選択

HTLVの感染が確認されている培養細胞から定法によりDNAを取り出し、これを制限酵素SalIで切断した。一方a.で核酸プローブを固定化した電極を反応容器内に設置し、反応容器の両端に温度制御機を取り付けて25~75℃の範囲の温度勾配をつけた。なお、電極を反応容器に設置する際、温度勾配方向には互いに絶縁された同種プローブ固定化電極を20個、それと垂直方向には異種プローブを固定化した電極を連結した(図8

参照)。この反応容器に制限酵素SalIで切断した試料核酸を添加し、2×SSC中で1時間、ハイブリダイゼーションを行った。

【0161】ハイブリダイゼーション後、DNA挿入剤であるアクリジンオレンジを添加し、それぞれの電極について、微分パルスボルタンメトリーを行い、アクリジンオレンジの酸化電流及びピーク電位値を測定した。測定条件は、パルス幅200mV、パルス電解時間100msec、サンプリング時間2000msec、掃引速度25mV/secとした。

【0162】測定の結果、他のプローブが60℃以上で急激に信号が得られなくなったのに対し、5'-TACTGGCCACCTGTCCAGAGCATCAG3'の配列を有する配列表の配列番号6の核酸プローブは65℃でもアクリジンオレンジのピーク電位値は13mVにシフトし、安定にハイブリダイズしていることがわかった。

【0163】以上のように本発明の方法を応用することにより最適な核酸プローブを選択することができる。

【0164】実施例9：核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

癌遺伝子c-Ha-ras、c-Ki-ras、N-rasの12番目、61番目のアミノ酸コドンに点突然変異を持つ遺伝子を確認するために下記表1に示すような核酸プローブを合成し、5'末端にアミノ基を導入した。

【0165】

【表1】

発癌遺伝子 *ras* に対する合成プローブ

発癌遺伝子	配列 (プローブ)		記号
c-Ha-ras/12	GTGGGCGCCGCGGTGTGGG	Gly (正常)	A 1
	CGC	Arg	2
	AGC	Ser	3
	TGC	Cys	4
	GAC	Asp	5
	GCC	Ala	6
	GTC	Val	7
c-Ha-ras/61	ACCGCCGCGCCAGGAGGAGTA	Gln (正常)	B 1
	CAT	His	2
	CAC	His	3
	AAG	Lys	4
	GAG	Glu	5
	CTG	Leu	6
	CCG	Pro	7
c-Ki-ras/12	GTGGAGCTGCTGCCCTAGG	Gly (正常)	C 1
	CGT	Arg	2
	TGT	Cys	3
	AGT	Ser	4
	GCT	Ala	5
	GAT	Asp	6
	GTT	Val	7
c-Ki-ras/61	ACAGCAGGTCAAGAGGAGTA	Gln (正常)	D 1
	AAA	Lys	2
	GAA	Glu	3
	CGA	Arg	4
	CCA	Pro	5
	CTA	Leu	6
	CAT	His	7
N-ras/12	GTGGAGCAGCTGGTGTGGG	Gly (正常)	E 1
	AGT	Ser	2
	CGT	Arg	3
	TGT	Cys	4
	GCT	Ala	5
	GAT	Asp	6
	GTT	Val	7
N-ras/61	ACAGCTCGACAAGAAGAGTA	Gln (正常)	F 1
	GAA	Glu	2
	AAA	Lys	3
	CCA	Pro	4
	CTA	Leu	5
	CGA	Arg	6
	CAT	His	7
	CAC	His	8

a. 核酸プローブ固定化電極の調製

核酸プローブ固定化用電極として、図9に示すような5×5cmの表面を電子線で活性化したグラファイトの基板の裏に薄い絶縁膜被覆した素子を用いた。この素子を縦6、横8の48分割し、他のマス目からの汚染がないように区切りを作成した。分割したマス目にそれぞれ異なる核酸プローブをシランカップリング剤とグルタルアルデヒドを用いて固定化した。それぞれのプローブを固定化した裏面の絶縁層にグラファイト基板から銀ペーストでリードを作成した。

【0166】 b. 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

人の血球から抽出した染色体遺伝子1μgを2×SSCに溶解した後、48分割したマス目に添加して95℃に加熱した。各マス目に人のβ-グロビン遺伝子に特異的な20merの標識核酸プローブを添加し、42℃でハイブリダイゼーションを行った。なお標識は、核酸プローブの末端にアミノ基を介してグルタルアルデヒドを用いてアクリジンオレンジを共有結合させることにより行った。ハイブリダイゼーション反応後、洗浄した後、電

電気化学的な検出を行った。その結果を図10に示す。ここで斜線の部分はポジティブに反応したマス目を示す。図10よりc-K1-rasの12及び61番目に点突然変異があることが分かった。以上のように、微量の検体であっても1度の操作で非常に簡単に、複数の検査項目を調べることができることが示された。

【0167】実施例10：核酸プローブ固定化基板を用いた試料核酸の塩基配列決定

a. 核酸プローブ固定化基板の調製

核酸プローブ固定化担体として5×5cmのガラス基板を用い、この基板を縦15、横15の225分割して各マス目にそれぞれ配列がランダムな異なった7merの核酸プローブを固定化した。また核酸プローブを固定化したそれぞれのマス目の裏面は、光ファイバーを接続できる構造とした。

【0168】b. 核酸プローブ固定化基板を用いた試料核酸の塩基配列決定

試料核酸として、酵母のアラニンのt-RNAに対するcDNAを用い、これを225分割された各マス目に添加して95℃に加熱した。加熱後、各マス目にt-RNAに相補的な20merの標識核酸プローブを添加して42℃でハイブリダイゼーションを行った。なお、前記標識核酸プローブは、その末端にアクリンオレンジを共有結合させることによって標識した。ハイブリダイゼーション反応の後、標識核酸プローブ洗浄後、各マス目の蛍光強度を測定した。結果を図11に示す。図11より、CCCGCAC、CGCACAC、CACCGCG、GCGCATC、TCAGCCA、CCATCCG、CGCGCGA、GAGGGAA、AAACGA、AACCCCTC、TCTCAGA、GAGGCCA、CAAGCTA、TAAGGCC、CCTGAGC、GCAGGTG、AGGTGGT、GCACCGC、CACACCA、CGGCGCA、GGCGCAT、CATCTCA、ACCATCCの各塩基配列を有する核酸プローブと反応することがわかった。

【0169】これらの配列を計算機を用いて整理した結果、酵母のアラニンのt-RNAに対するcDNAの塩基配列は、配列表の配列番号59に示すように3'-CCCGCACACCGCGCATCAGCCATCGCGCGAGGGAAACGAACCCCTCTCAGAGGCCAAGCTAAGGCCCTGAGCAGGTGGT-5'であることが推察できた。このように、微量の検体であっても、1度の操作で非常に簡単に遺伝子塩基配列を決定できた。

【0170】実施例11：試料核酸固定化電極を用いたHLAタイピング

a. 試料核酸固定化基板の調製

まず、人の末梢静脈血から染色体遺伝子を分離した。この遺伝子を3つに分けて、それぞれ別々の制限酵素EcoRI、PstI、MspIで切断し、カラムクロマト

グラフィーで分子量別にフラクションa~jとして分取した。

【0171】一方、10×3cmのグラファイト基板の表面を電子線で活性化し、裏面には薄い絶縁膜を被覆して素子を形成した。この素子を縦10、横3に30分割し、他のマス目からの汚染がないように区切りを作成した。

【0172】この分割した各マス目にフラクションa~jの遺伝子を注入し、100mMの塩化ナトリウムを添加して100℃で吸着により固定化した。各遺伝子を固定化した後、基板の裏面にグラファイト基板から銀ペーストでリードを作成した。

【0173】b. 試料核酸固定化基板を用いた遺伝子の検出

HLA抗原遺伝子に相補的なプローブDQβ2 (AGGGATCCCCGCAGAGGATTTCTGTGTA) (配列表の配列番号60参照)の末端にアミノ基を介してグルタルアルデヒドを用いてアミノアクリンと共有結合して標識した。基板の各マス目に標識したプローブを添加し、2×SSC中で42℃でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション反応後、界面活性剤を含む緩衝液で洗浄した後、電気化学的な測定を行った。すなわち、目的とする遺伝子が存在するマス目ではアミノアクリンが電気化学的に酸化されて電流が流れるので、この電流値を測定した。その結果、図12に示すような結果が得られた。これにより本遺伝子検出法を用いることで人の遺伝子のHLAタイピングが可能であることが示された。

【0174】実施例12：核酸プローブ固定化基板を用いた食品腐敗検査

a. 核酸プローブ固定化基板の調製

5×5cmのガラスの基板表面にカーボンを蒸着、或いはスパッタすることでカーボン被膜を作成した。このカーボン被膜表面にプラズマを照射することでカーボン表面の活性化を行った。この基板を5×3分割し、基板の裏面には絶縁膜を被覆した。また他のマス目からの汚染がないように区切りを作成した。それぞれのマス目の裏面の絶縁層にグラファイト基板から銀ペーストでリードを作成した。この基板上のそれぞれのマス目に、サルモネラ菌、病原性大腸菌、及びブドウ球菌に対する核酸プローブを固定化した。固定化は、合成した核酸プローブの末端にアミノ基を導入し、グルタルアルデヒド、及びシランカップリング剤を架橋剤として用いて、このアミノ基を介して行った。

【0175】b. 核酸プローブ固定化基板を用いた食品腐敗検査

食品サンプル1~5を加熱フェノール処理してサンプル中の蛋白質を変性、沈殿させ、核酸成分を抽出した。この精製試料各酸を熱変性して一本鎖にして各マス目に添加し、42℃で核酸プローブとハイブリダイゼーション

させた。なおこのハイブリダイゼーション反応の際、サルモネラ菌、病原性大腸菌、及びブドウ球菌に対する遺伝子検出用の標識した第2核酸プローブをそれぞれ添加した。これら第2プローブの標識は、プローブ末端にアミノ基を導入し、このアミノ基を介して化学発光物質であるルシゲニンをグルタルアルデヒドを用いて共有結合させることによって行った。

【0176】前記ハイブリダイゼーション反応後、界面活性剤を含む緩衝溶液で洗浄した後、マス目中に1/15 M 磷酸緩衝溶液を添加して基板上に2.0 V (vs. SCE) の電位をかけた。結果を図13に示す。ここで斜線部分は発光信号が得られたマス目を示している。発光信号の強度は食品中に存在する遺伝子の量と直線関係にあり、また遺伝子を定量することも可能であった。このように食品中に存在するバクテリアを検出、定量することで、食品の腐敗度を調べる事ができた。

【0177】実施例13： 核酸プローブ固定化基板を用いた薬品汚染度検査

a. 核酸プローブ固定化基板の調製

5×5 cmのガラスの基板表面にカーボンを蒸着、或いはスパッタすることで、カーボン被膜を作成した。このカーボン被膜表面にプラズマを照射することでカーボン表面の活性化を行った。この基板を5分割し、基板の裏面には絶縁膜を被覆した。また他のマス目からの汚染がないように区切りを作成した。それぞれのマス目の裏面の絶縁層にグラファイト基板から銀ペーストでリードを作成した(図面)。この基板上のそれぞれのマス目に、サルモネラ菌、病原性大腸菌、ブドウ球菌、シウドモナス、及びバチラスに対する核酸プローブを固定化した。固定化は、合成した核酸プローブの末端にアミノ基を導入し、グルタルアルデヒド、及びシランカップリング剤を架橋剤として用いて、このアミノ基を介して行った。

b. 核酸プローブ固定化基板を用いた薬品汚染度検査
薬品サンプルを加熱フェノール処理してサンプル中の蛋白質を変性、沈殿させ、核酸成分を抽出した。この精製試料核酸を熱変性して一本鎖にし、各マス目に添加して42℃で核酸プローブとハイブリダイゼーションさせた。なおハイブリダイゼーション反応の際、サルモネラ菌、病原性大腸菌、ブドウ球菌、シウドモナス、及びバチラスに対する遺伝子検出用の標識した第2核酸プローブをそれぞれ添加した。これら第2プローブの標識は、プローブ末端にアミノ基を導入し、このアミノ基を介して化学発光物質であるアクリジニウムエステルをグルタルアルデヒドを用いて共有結合させることにより行った。

【0178】前記ハイブリダイゼーション反応後、界面活性剤を含む緩衝溶液で洗浄した後、マス目中に1/15 M 磷酸緩衝溶液を添加して基板上に2.0 V (vs. SCE) の電位をかけた。この電気化学発光反応の結果、図14に示すような発光信号が得られた。この発光

信号の強度は薬品中に存在する遺伝子の量と直線関係にあり、また遺伝子を定量することも可能であった。このように薬品中に存在するバクテリアを検出、定量することで薬品の汚染度を調べる事ができた。

【0179】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば核酸プローブを用いた遺伝子検出を、放射性同位体を用いることなく簡便かつ短時間でこなすことができる。従って、本発明は遺伝子診断法や遺伝子工学の分野等、特定の遺伝子を検出する方法として極めて有用である。

【0180】【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：15

配列の型：核酸

配列

30

GTG GCC GTG CAT GTG

Val Ala Val His Val

配列番号：2

配列の長さ：15

配列の型：核酸

配列

30

GTG GCC ATG CAT GTG

Val Ala Met His Val

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

TGCAGTTCCG GTGGCTGATC 20

配列番号：4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTACTTTACT GACAAACCCG ACCTAC 26

配列番号：5

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CCGCAGCTGC ACTAATGATT GAACTTGAGA AG 32

配列番号：6

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

TACTGGCCAC CTGTCCAGAG CATCAG 26

配列番号：7

39

配列の長さ: 24
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 GTGGTGGATT TGCCATCGGG TTTT 24
 配列番号: 8
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 CTTACAGTC TCTACTGTGC 20
 配列番号: 9
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 CGGATACCCA GTCTACGTGT 20
 配列番号: 10
 配列の長さ: 22
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 CCCTACAATC CCACCAGCTC AG 22
 配列番号: 11
 配列の長さ: 19
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 CGGCAGTTCT GTGACAGGG 19
 配列番号: 12
 配列の長さ: 21
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 GAGCCGATAA CGCGTCCATC G 21
 配列番号: 13
 配列の長さ: 26
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 CACGCGCCCG CCTACCTGA GGCCGCC 26
 配列番号: 14
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 GTGGGCGCCG GCGGTGTGGG 20
 配列番号: 15
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸

40

鎖の数: 一本鎖
 配列
 GTGGGCGCCC GCGGTGTGGG 20
 配列番号: 16
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 GTGGGCGCCA GCGGTGTGGG 20
 10 配列番号: 17
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 GTGGGCGCCT GCGGTGTGGG 20
 配列番号: 18
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 20 配列
 GTGGGCGCCG ACGGTGTGGG 20
 配列番号: 19
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 GTGGGCGCCG CCGGTGTGGG 20
 配列番号: 20
 配列の長さ: 20
 30 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 GTGGGCGCCG TCGGTGTGGG 20
 配列番号: 21
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 ACCGCGGCC AGGAGGAGTA 20
 40 配列番号: 22
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列
 ACCGCGGCC ATGAGGAGTA 20
 配列番号: 23
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 50 配列

41
ACCGCCGGCC ACGAGGAGTA 20
配列番号: 2 4
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACCGCCGGCA AGGAGGAGTA 20
配列番号: 2 5
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACCGCCGGCG AGGAGGAGTA 20
配列番号: 2 6
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACCGCCGGCC TGGAGGAGTA 20
配列番号: 2 7
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACCGCCGGCC CGGAGGAGTA 20
配列番号: 2 8
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACCGCCGGCC GGGAGGAGTA 20
配列番号: 2 9
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
GTTGGAGCTG GTGGCGTAGG 20
配列番号: 3 0
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
GTTGGAGCTC GTGGCGTAGG 20
配列番号: 3 1
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
GTTGGAGCTT GTGGCGTAGG 20
配列番号: 3 2

42

配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
GTTGGAGCTA GTGGCGTAGG 20
配列番号: 3 3
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
10 配列
GTTGGAGCTG CTGGCGTAGG 20
配列番号: 3 4
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
GTTGGAGCTG ATGGCGTAGG 20
配列番号: 3 5
配列の長さ: 2 0
20 配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
GTTGGAGCTG TTGGCGTAGG 20
配列番号: 3 6
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACAGCAGGTC AAGAGGAGTA 20
30 配列番号: 3 7
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACAGCAGGTA AAGAGGAGTA 20
配列番号: 3 8
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
40 配列
ACAGCAGGTC AAGAGGAGTA 20
配列番号: 3 9
配列の長さ: 2 0
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖
配列
ACAGCAGGTC GAGAGGAGTA 20
配列番号: 4 0
配列の長さ: 2 0
50 配列の型: 核酸

43

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCAGGTC CAGAGGAGTA 20

配列番号：4 1

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCAGGTC TAGAGGAGTA 20

配列番号：4 2

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCAGGTC ATGAGGAGTA 20

配列番号：4 3

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCAGGTC ACGAGGAGTA 20

配列番号：4 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTTGGAGCAG GTGGTGTGG 20

配列番号：4 5

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTTGGAGCAA GTGGTGTGG 20

配列番号：4 6

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTTGGAGCAC GTGGTGTGG 20配列番号：4 7

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTTGGAGCAT GTGGTGTGG 20

配列番号：4 8

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTTGGAGCAG CTGGTGTGG 20

44

配列番号：4 9

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTTGGAGCAG ATGGTGTGG 20

配列番号：5 0

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

10 鎖の数：一本鎖

配列

GTTGGAGCAG TTGGTGTGG 20

配列番号：5 1

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCTGGAC AAGAAGAGTA 20

配列番号：5 2

20 配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCTGGAG AAGAAGAGTA 20

配列番号：5 3

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

30 ACAGCTGGAA AAGAAGAGTA 20

配列番号：5 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCTGGAC CAGAAGAGTA 20

配列番号：5 5

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

40 鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCTGGAC TAGAAGAGTA 20

配列番号：5 6

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCTGGAC GAGAAGAGTA 20

配列番号：5 7

50 配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCTGGAC ATGAAGAGTA 20

配列番号：58

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

TGCTGGACGA GTCCGGAATC GAACCGGAGA CTCTCCCAAG CAAAGGGACG GCGCTACCGA
CTACGCGCCA CACGCC 77

配列番号：60

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

AGGGATCCCC GCAGAGGATT TCGTGATACC 29

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による自動遺伝子検出装置の一具体例を模式的に示す図。

【図2】図1に示す自動遺伝子検出装置における反応槽および試料核酸精製装置の他の態様を示す斜視図。

【図3】図1に示す自動遺伝子検出装置に用いられる温度コントローラの一具体例を示す斜視図。

【図4】電気化学発光を利用する自動遺伝子検出装置の具体例を模式的に示す図。

【図5】FAPの病因となる塩基置換及びこれによる制限酵素認識部位の形成を示す図。

【図6】TTR遺伝子のB a l I 切断部位を示す図。

【図7】核酸プローブ固定化電極を用いたハイブリダイゼーション反応の経時変化の測定結果を示す図。

【図8】核酸プローブの選択に用いた温度勾配反応槽を示す図。

* 鎖の数：一本鎖

配列

ACAGCTGGAC ACGAAGAGTA 20

配列番号：59

配列の長さ：77

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

【図9】核酸プローブ固定化基板を示す図。

【図10】核酸プローブ固定化基板を用いた遺伝子検出の結果を示す図。

【図11】核酸プローブ固定化基板を用いた遺伝子検出の結果を示す図。

【図12】核酸プローブ固定化基板を用いたHLAタイピングの結果を示す図。

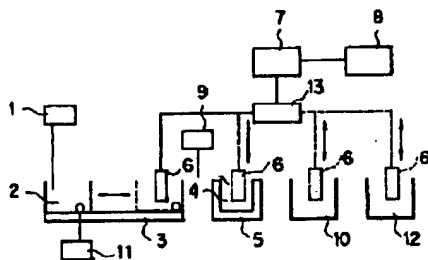
【図13】核酸プローブ固定化基板を用いた食品腐敗検査の結果を示す図。

【図14】核酸プローブ固定化基板を用いた薬品汚染度検査の結果を示す図。

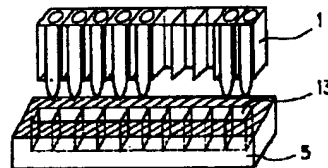
【符号の説明】

1、31…遺伝子サンプル精製装置、2…固定化槽、4…反応槽、5、35…温度コントローラ、6…担体、7…電気信号検出制御装置、8、40…計算機、10…検出槽、12…解離処理層、13、44…移動装置、21…恒温槽、22…コントローラ、23…温度センサ、32…核酸プローブ供給装置、33…反応セル、34…固定化用電極、37…参照電極、38…光ファイバ、39…ファンクションジェネレータ/ポテンシオスタット、41…フォトマル、42…光子カウンタ、43…洗浄槽

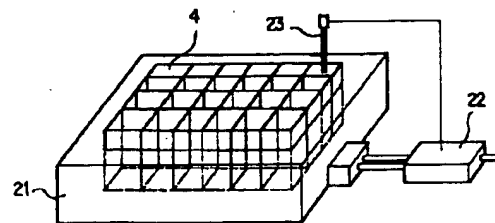
【図1】



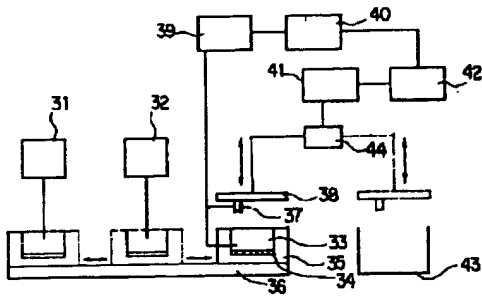
【図2】



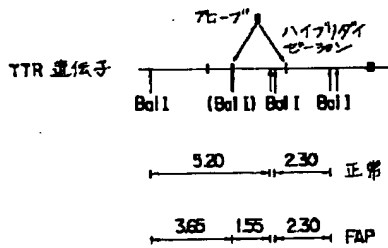
【図3】



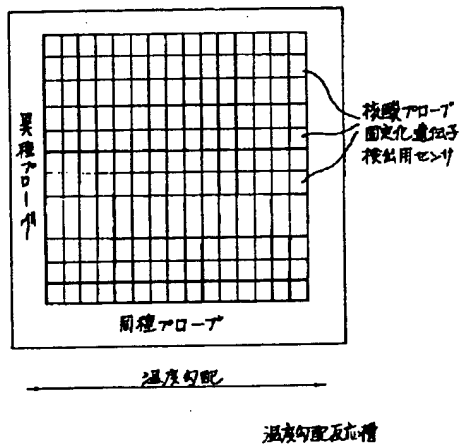
【図4】



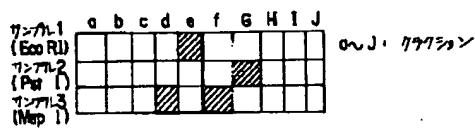
【図6】



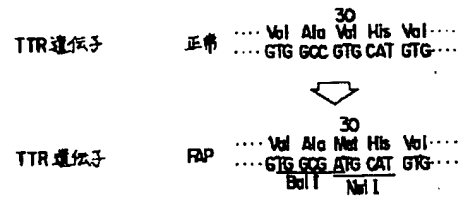
【図8】



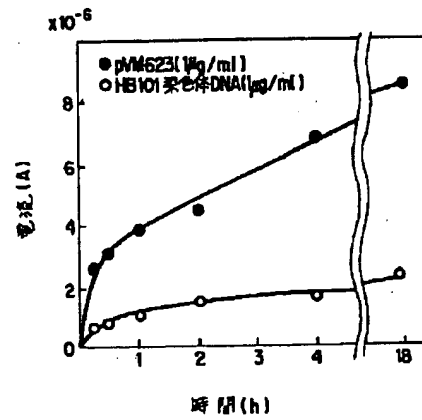
【図12】



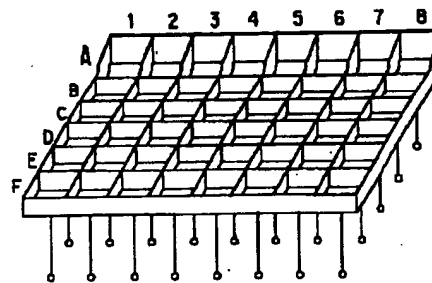
【図5】



【図7】



【図9】



【図10】

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C								
D								
E								
F								

【図11】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A															
B															
C															
D															
E															
F															
G															
H															
I															
J															
K															
L															
M															
N															
O															

ホモログに属するアローブ

A2 : CCCG CAG
A11 : CGCAG CAG
B4 : CACCG CG
B13 : GCGCAT C
D2 : TCAGCCA
E9 : CCATCCG
F13 : CGCGCGA
G4 : GAGGGA
G6 : AAACGAA
G15 : AACCTC
H11 : TCTCAGA
J2 : GAGGCCA
J11 : CAAGCTA
J4 : TAAGGCC
J8 : CCTGAGC
J13 : GCAGGTG
K4 : AGGTGTT
L6 : GCACCGC
L13 : CACACCA
N7 : CGCGCGA
N10 : GCGCGAG
N13 : CATCTCA
O3 : ACCATCC

【図13】

サンプル	1	2	3	4	5
サンプル 1					
サンプル 2					
サンプル 3					
サンプル 4					
サンプル 5					

a = リンネアロブに対するアローブ
b = 赤藻性大腸菌に対するアローブ
c = アドワ球菌に対するアローブ

【図14】

a	b	c	D	E

a = リンネアロブに対するアローブ
b = 赤藻性大腸菌に対するアローブ
c = アドワ球菌に対するアローブ
D = シュウドモナスに対するアローブ
E = パチラスに対するアローブ

フロントページの続き

(72)発明者 後藤 雅式

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株
式会社東芝総合研究所内